

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTA' DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZA DEL FARMACO
XIX CICLO 2003-2006

**Nuovi glicolipidi bioattivi da echinodermi:
isolamento e determinazione strutturale**

TUTOR:
PROF. ALFONSO MANGONI

CANDIDATA:
DOTT. CATERINA de ROSA

COORDINATORE:
PROF. ENRICO ABIGNENTE

INDICE

PARTE I	5
INTRODUZIONE.....	5
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1. OGGETTO DELLA TESI	6
1.2. GLI ECHINODERMI.....	11
1.3. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	18
2. TECNICHE DI DETERMINAZIONE STRUTTURALE.....	19
2.1. INTRODUZIONE	19
2.2. SPETTROMETRIA DI MASSA.....	21
2.3. RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE.....	24
2.4. DICROISMO CIRCOLARE.....	31
2.5. GAS-CROMATOGRAFIA	34
2.6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	36
PARTE II.....	37
ISOLAMENTO E DETERMINAZIONE STRUTTURALE DI GLICOLIPIDI DA ECHINODERMI	37
3. I GLICOLIPIDI.....	38
3.1. INTRODUZIONE	38
3.2. TECNICHE DI ISOLAMENTO	43
3.3. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	48
4. I GLICOSFINGOLIPIDI.....	49
4.1. INTRODUZIONE	49
4.2. METODI GENERALI DI DETERMINAZIONE STRUTTURALE	52
4.2.1 <i>Struttura della catena oligosaccaridica.</i>	52
4.2.2 <i>Principali esperimenti NMR utilizzati.</i>	57
4.2.3 <i>Struttura del ceramide.</i>	59
4.2.4 <i>Configurazione assoluta.</i>	61
4.3. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	64

5. GANGLIOSIDI	65
5.1. INTRODUZIONE	65
5.2. INFLUENZA DEI GANGLIOSIDI NEL PROCESSO ANGIOGENICO.....	70
5.3. NUOVA METODICA DI ISOLAMENTO DI GANGLIOSIDI	74
5.3.1. Isolamento di gangliosidi da <i>Paracentrotus lividus</i>	75
5.3.2. Determinazione strutturale dei gangliosidi 1 e 2.....	81
5.3.3. Effetto dei gangliosidi 1 e 2 sulla proliferazione di cellule endoteliali umane.....	93
5.4. GANGLIOSIDI DALLA STELLA <i>OREASTER RETICULATUS</i>	98
5.4.1. Isolamento dei peracetil derivati dei gangliosidi 3 e 4.....	99
5.4.2. Determinazione strutturale del ganglioside 3.....	100
5.4.3. Degradazione chimica del ganglioside 3.....	117
5.4.4. Determinazione strutturale del ganglioside 4.....	121
5.5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	128
6. CEREBROSIDI.....	131
6.1. INTRODUZIONE	131
6.2. OREACEREBROSIDI DALLA STELLA <i>OREASTER RETICULATUS</i>	132
6.2.1. Isolamento degli oreacerebrosidi 10a-11f.....	132
6.2.2. Purificazione e determinazione strutturale degli oreacerebrosidi 10a-10f.....	135
6.2.3. Purificazione e determinazione strutturale degli oreacerebrosidi 11a-11f.....	146
6.2.4. Determinazione della stereochimica assoluta degli oreacerebrosidi 11a-11f.....	152
6.3. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	155
PARTE III.....	156
PROCEDURE SPERIMENTALI.....	156
7. METODI GENERALI	157
7.1 INTRODUZIONE	157
7.2. GANGLIOSIDI DA <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i>	160
7.3. GANGLIOSIDI 3 E 4 DALLA STELLA <i>OREASTER RETICULATUS</i>	165
7.4. OREACEREBROSIDI DALLA STELLA <i>OREASTER RETICULATUS</i>	172

PARTE I

INTRODUZIONE

1. Introduzione

1.1. Oggetto della tesi

In tutti gli organismi viventi i composti chimici sono sintetizzati e degradati grazie ad una serie di reazioni mediate da enzimi: questi processi sono conosciuti come “metabolismo”.

Composti come zuccheri, aminoacidi, acidi grassi comuni ed acidi nucleici sono essenziali per la vita ed il benessere di qualsiasi organismo e per questo sono definiti metaboliti primari: le reazioni mediante le quali sono sintetizzati ed utilizzati sono simili in tutte le specie e costituiscono il metabolismo primario.

Tuttavia, esistono anche altre vie metaboliche, questa volta caratteristiche di ogni specie, che portano a composti anch'essi tipici di ciascuna specie: essi sono i metaboliti secondari, ed i processi attraverso i quali sono sintetizzati ed utilizzati rappresentano il metabolismo secondario. I due tipi di metabolismo sono strettamente interconnessi, infatti, il primario fornisce le molecole che rappresentano il punto di partenza per il metabolismo secondario. Il numero di mattoni biosintetici è

estremamente esiguo, ma nonostante ciò le numerose possibilità di combinazione permettono di produrre una notevole varietà di composti. In molti casi le funzioni dei metaboliti secondari non sono conosciute, ma è difficile credere che gli organismi abbiano riservato una consistente parte delle loro risorse metaboliche a molecole prive di significato biologico.

Gli studi effettuati dimostrano che tali composti sono infatti fondamentali per l'espressione dell'individualità delle diverse specie viventi e per la loro coesistenza e coevoluzione. Gli organismi possono effettuare diversi tipi di controllo chimico mediante i metaboliti secondari:

- a) attrazione sessuale
- b) feedants, antifeedants, repellenti e tossine
- c) difesa ed allarme
- d) sviluppo ed evoluzione
- e) comportamento sociale.

I metaboliti secondari possiedono spesso strutture molto singolari cui può essere legata un'attività biologica. La natura infatti è riuscita ad elaborare, in centinaia di anni, un processo di

chimica combinatoriale costruendo un arsenale di nuove molecole bioattive.

Lo studio sistematico del metabolismo secondario ha fornito e fornisce tuttora un notevole contributo allo sviluppo delle scienze farmaceutiche contribuendo con un gran numero di molecole bioattive, molte delle quali sono diventate farmaci indispensabili per la vita.

In realtà l'umanità si è avvalsa da sempre dell'utilizzo di preparati di origine naturale per diversi scopi come la cura di determinate patologie. Con la nascita della chimica organica, nel XIX secolo, gli scienziati hanno cominciato ad esaminare gli estratti bioattivi isolando i principi attivi in essi presenti: da tale esame è stata ottenuta un'enorme varietà di metaboliti secondari.

Inizialmente la ricerca delle sostanze di origine naturale, a causa della più facile reperibilità del materiale biologico, era rivolta al mondo vegetale e microbico terrestre, e solo molto più recentemente gli scienziati hanno rivolto la loro attenzione alle specie che popolano il mondo marino.¹⁻³ Lo studio della chimica degli organismi marini è stato per molto tempo trascurato

principalmente per la difficile reperibilità degli organismi e si è sviluppato solo alla fine degli anni sessanta, quando le apparecchiature per le immersioni subacquee sono diventate di comune disponibilità. Oggi la chimica delle sostanze naturali marine è una disciplina ampiamente affermata a livello internazionale, e gruppi di ricerca che si dedicano a questo campo operano in tutto il mondo; il numero di nuovi metaboliti riportati ogni anno è in costante aumento, dimostrando che il panorama dei prodotti naturali marini è ancora lontano dall'essere stato esplorato completamente.^{4,5}

Gli oceani rappresentano, dunque, ancora oggi una grande e poco sfruttata risorsa per la scoperta di nuove molecole guida idonee allo sviluppo di nuovi farmaci. Recenti studi hanno infatti dimostrato che almeno il 10% degli organismi marini produce sostanze citotossiche o con spiccate attività antibiotiche e/o antivirali.

Negli ultimi 3 o 4 decenni del XX secolo sono stati isolati migliaia di nuovi prodotti di provenienza marina, molti dei quali notevolmente diversi dai metaboliti di origine terrestre. La continua ricerca di nuovi metaboliti, quindi, è essenziale per la

costruzione di una sempre più ricca libreria di molecole chimicamente differenti, che possono rappresentare nuovi strumenti terapeutici oppure molecole guida per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Nella presente tesi verrà discusso uno studio sistematico, da me condotto durante i tre anni di dottorato, su sostanze organiche naturali provenienti da varie specie di Echinodermi, con particolare attenzione alla classe dei glicolipidi, molecole poco studiate finora ma dotate di numerose attività biologiche e farmacologiche.

1.2. Gli Echinodermi

Gli Echinodermi rappresentano un gruppo di animali marini che allo stadio adulto sono principalmente bentonici, ossia abitanti il fondo del mare, anche se non mancano eccezioni di forme pelagiche. Questo phylum comprende alcuni tra gli organismi marini più noti e diffusi, quali i crinoidi (gigli di mare), le stelle marine, i ricci, le oloturie e le ofiurie; complessivamente si annoverano quasi seimila specie, distribuite in tutti i mari del mondo, dagli oceani tropicali a quelli polari.

Tutti gli echinodermi, in misura più o meno evidente, presentano una simmetria pentaradiata (anche se quella bilaterale delle larve non si annulla mai completamente): il corpo, cioè, è idealmente divisibile in cinque sezioni disposte intorno ad un asse centrale.

Caratteristica è la presenza, in questi animali marini, di uno scheletro esterno, definito dermascheletro, che svolge diverse funzioni: movimento, respirazione, alimentazione, difesa. Esso è costituito da placche calcaree (composte soprattutto da carbonato di calcio e magnesio) che possono essere articolate tra di loro

(come nelle stelle e nelle ofiure) o fuse insieme a formare un involucro rigido (come nei ricci); tale scheletro, a volte velenoso, è rivestito quasi sempre di aculei, granuli, tubercoli ed altre escrescenze (infatti la parola Echinoderma deriva dal greco e significa letteralmente “pelle spinosa”), che rendono la superficie corporea di questi organismi assai ruvida al tatto o, nel caso dei ricci e certe stelle di mare, addirittura intoccabile a causa dei lunghi aculei.

Gli echinodermi hanno un sistema di locomozione singolare: al posto di scheletro e muscoli, possiedono un complesso apparato, detto sistema acquifero, che utilizza la pressione idraulica per muovere un gran numero di sottili piedini, detti pedicelli, che sono generalmente retraibili all'interno e disposti lungo un solco; la loro punta produce una secrezione adesiva e si attaccano a qualsiasi tipo di substrato anche grazie all'azione di ventose finali; il tutto è collegato all'esterno da una piccola apertura, il madreporite.

Altra caratteristica di questi animali marini è la loro capacità di rigenerazione: sono in grado cioè di ricostruire parti del corpo (le braccia, ad esempio) qualora esse vengano spezzate o

perdute; in alcuni casi addirittura da un piccolo frammento l'animale riesce a anche a rigenerarsi completamente.

L'alimentazione degli echinodermi è varia, ma in genere essi si cibano di materiale in sospensione o di deposito, oppure mangiano alghe e plancton: ci sono anche specie detritivore, specie che si nutrono di limo, organismi erbivori e filtratori. Solo le stelle marine sono predatrici: oltre che di altri echinodermi, si nutrono anche di molluschi, crostacei ed altri invertebrati.

Gli echinodermi hanno per lo più sessi separati, ma la fecondazione avviene in acqua così come lo sviluppo delle larve: esse, a differenza degli organismi adulti, sono a simmetria bilaterale e conducono vita planctoniana fino a quando non completano lo sviluppo sul fondo marino e subiscono la metamorfosi che conferirà loro l'aspetto definitivo.

Esistono 5 classi ben distinte di echinodermi:

1. Asteroidi (stelle marine): sono provvisti tipicamente di 5 braccia (che spesso però possono essere più numerose) disposte intorno a un corpo più o meno circolare: procedono sul fondo lentamente, usando i pedicelli ambulacrali per spostarsi e le braccia per sollevarsi. Hanno un modo singolare di nutrirsi, cioè

flettono verso l'esterno l'intero stomaco, avvolgono la preda e poi la digeriscono lentamente (Fig.1.1).



Figura 1.1. Stella marina

2. Echinoidi (ricci di mare): comprendono circa 800 specie viventi; non hanno le braccia ma uno scheletro esterno ricoperto di spine e aculei che possono rilasciare tossine, anche pericolose (Fig.1.2).

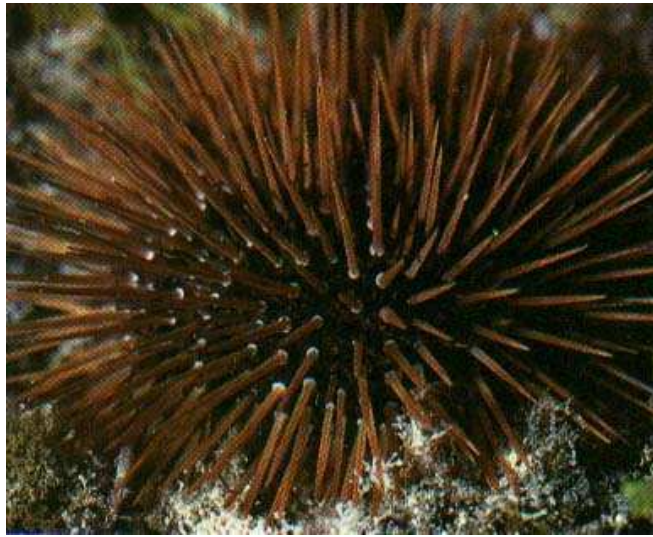


Figura 1.2. Riccio di mare

3. Ofiuridi (ofiure, stelle serpentine): hanno braccia molto lunghe e serpentiformi, particolarmente mobili, che permettono un movimento veloce (Fig.1.3).

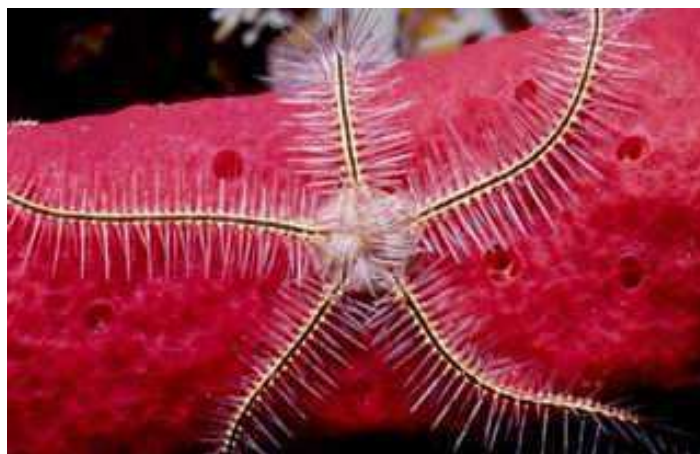


Figura 1.3. Stella serpentina

4.Oloturidi (cetrioli di mare, oloturie): il corpo può essere molle o rigido, coriaceo; strisciano lentamente sul fondo marino. La simmetria in questo caso è bilaterale (due parti uguali); si nutrono di detriti che setacciano dal sedimento e poi espellono gli scarti. Possono addirittura espellere completamente i visceri e rigenerarli (Fig.1.4).



Figura 1.4. Cetriolo di mare

5.Crinoidi (gigli di mare): composti da un peduncolo basale con cui si fissano a un substrato, possiedono lunghe braccia sottili ricoperte di appendici piccole (pinnule) che danno loro l'aspetto di animali piumati. Si nutrono di plancton e detriti (Fig.1.5).



Figura 1.5. Giglio di mare

Gli echinodermi si sono dimostrati una fonte estremamente ricca di metaboliti secondari, secondi in questo solo ai poriferi (le spugne marine).⁶ Tra le classi di composti più caratteristiche ritroviamo i glicolipidi: le stelle marine, i ricci di mare e le oloturie contengono infatti una grande varietà di glicosidi steroidei (saponine), che non sono invece presenti negli animali terrestri, ma solo nelle piante.

Inoltre gli echinodermi sono gli organismi marini più ricchi di glicosfingolipidi, alcuni simili, ma altri molto diversi, da quelli prodotti dagli animali terrestri.

1.3. Riferimenti bibliografici

1. O'Neill, M.; Lewis J. A. in *Human Medicinal agents from Plants*, Kinghorn, A. D., Balandrin, M. F. , Eds.; ACS Symposium Series 534; American Chemical Society: Washington, D. C., **1993**, 48-55.
2. Cragg, G. M.; Newmann, D. J.; Snader K. M., *J Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 52-60.
3. Brian P.; Peterson T., *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, **2002**, *114*, 357-382.
4. Munro, M. H. G. Blunt, J. W.; Lake, R. J.; Litaudon, M.; Battershill, C. N.; Page, M. J., *Sponges in time and space*, Ed. By Van Soest Van Kempen TMG, Braekman J. C. Rotterdam, **1994**, 473-484.
5. Faulkner, D.J., *Nat. Prod. Rep.*, 2002, 1-48 and all the preceding reviews of the series.
6. V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, M. Di Rosa, A. Ianaro, P. Maffia, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 1573-1578.

2. Tecniche di determinazione strutturale.

2.1. Introduzione

La determinazione della struttura di un nuovo metabolita bioattivo è il primo, necessario passo per ogni successivo studio. Fino ad alcuni decenni fa, la determinazione strutturale di una nuova sostanza organica era perseguita esclusivamente attraverso l'uso di tecniche chimiche (degradazione e interconversione di gruppi funzionali). Lo sviluppo delle tecniche spettroscopiche, che si sono prima affiancate alle tecniche chimiche, per poi sostituirle quasi completamente, ha rivoluzionato questo approccio. Oggi è possibile determinare completamente ed in maniera non distruttiva la struttura di sostanze organiche complesse disponendo di pochi milligrammi, o addirittura di frazioni di milligrammo, di campione. Il lavoro di determinazione strutturale descritto in questa tesi è quindi largamente basato su tecniche spettroscopiche, anche se in alcuni casi non è stato possibile fare a meno di tecniche degradative. Le principali tecniche spettroscopiche impiegate per la determinazione strutturale dei composti isolati sono state la

spettrometria di massa (MS) e la risonanza magnetica nucleare (NMR).

2.2. Spettrometria di massa

La determinazione della formula molecolare, realizzata attraverso spettri di massa a bassa e ad alta risoluzione, è il primo ed essenziale passo nello studio di una nuova molecola organica di interesse biomedico.

La spettroscopia di massa si basa sulla ionizzazione delle molecole, che permette di risalire, misurando il rapporto massa/carica (m/z) dello ione molecolare ottenuto, alla massa totale della molecola. Inoltre dalla misura esatta (ad alta risoluzione) della massa è possibile ricavare la formula molecolare del composto, che è l'informazione dalla quale occorre sempre partire nella determinazione strutturale di un composto incognito. È inoltre possibile che lo ione molecolare si rompa dando luogo a frammenti; la frammentazione può essere spontanea (come avviene nella sorgente ad impatto elettronico) o indotta (come avviene negli spettrometri di massa tandem). In entrambi i casi, le frammentazioni seguono alcune regole generali, e danno utili informazioni sulla struttura della molecola in esame.

L'Electro Spray Ionization (ESI) è tra le tecniche di spettrometria di massa oggi più utilizzate, ed è particolarmente adatta alle sostanze organiche di origine biologica.

L'ESI è una tecnica usata soprattutto per lo studio di biomolecole molto polari idrosolubili, anche cariche. Il campione è introdotto come soluzione in un solvente volatile, come acqua, metanolo, acetonitrile, cloroformio o loro miscele, contenente un po' di acido organico. Questa soluzione è spinta ad alta pressione attraverso un ago capillare, che è caricato ad un potenziale positivo di qualche migliaio di volt, e uscendo dall'ago si suddivide in tante piccole (1-2 μm) goccioline, generando uno spray. Dato l'elevato potenziale dell'ago, ogni gocciolina ha un eccesso di carica positiva. A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina. La densità di carica della gocciolina quindi aumenta, finché diventa così alta che ioni positivi del soluto possono essere espulsi dalla gocciolina. Questi ioni sono poi spinti da un campo elettrico attraverso una serie di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dello spettrometro di massa, dove sono poi accelerate ed inviate all'analizzatore. Una caratteristica

fondamentale dell'electrospray è che, per molecole di massa piuttosto elevata, gli ioni che vengono espulsi dalle goccioline hanno carica multipla, si tratta cioè di molecole poliprotonate. Per molti composti il numero delle cariche è più o meno proporzionale alla grandezza delle molecole, per cui il rapporto m/z di molecole che escono dall'electrospray è spesso nel range 500-2000. La formazione di ioni con cariche multiple è molto importante, perché riduce il rapporto massa/carica degli ioni, permettendo l'analisi di molecole molto pesanti come intere proteine, purché esse abbiano molti siti ionizzabili.

Nella spettrometria di massa tandem vengono accoppiati due stadi di analisi di massa. Uno ione avente un determinato valore di m/z (ione precursore) viene selezionato ed isolato nel primo stadio di analisi; successivamente, viene eccitato ed ulteriormente frammentato. Nel secondo stadio di analisi, possono essere acquisiti tutti gli ioni prodotti oppure solo quelle più intensi. Come detto in precedenza, le frammentazioni avvengono secondo alcune regole generali, e pertanto l'analisi dei frammenti ottenuti dal secondo stadio di analisi fornisce utili informazioni strutturali relative alla molecola in esame.

2.3. Risonanza magnetica nucleare

Tra le tecniche usate per la determinazione strutturale dei metaboliti isolati, quella di gran lunga più importante è stata la risonanza magnetica nucleare (NMR). In particolare, oltre ai comuni esperimenti ^1H - e ^{13}C -NMR si è fatto un ampio uso di esperimenti NMR bidimensionali, che nella maggior parte dei casi sono stati sufficienti per la completa determinazione strutturale del composto in esame.

Gli esperimenti NMR bidimensionali presentano due importanti vantaggi rispetto ai corrispondenti esperimenti monodimensionali, e questi vantaggi diventano sempre più evidenti al crescere della complessità della molecola. In primo luogo si ha una drastica riduzione del tempo di acquisizione, perché da un singolo spettro si possono ricavare informazioni ottenibili solo da un grande numero di spettri monodimensionali; inoltre la presenza di due dimensioni rende molto più improbabile la possibilità di sovrapposizione di segnali, il che permette di discernere e attribuire anche nuclei che risuonano in zone molto affollate dello spettro. Infine alcuni esperimenti

NMR bidimensionali mettono in evidenza fenomeni non accessibili mediante esperimenti monodimensionali: è il caso degli esperimenti ROESY, e di tutti gli esperimenti bidimensionali a multiplo quanto. Qui di seguito sono sommariamente descritti i principali esperimenti NMR bidimensionali usati.

Il COSY¹ (COrrrelation SpectroscopY) è stato il primo esperimento bidimensionale NMR inventato, il primo usato comunemente, ed ancora oggi è probabilmente, nelle sue varie versioni, l'esperimento 2D NMR più usato. Il COSY è un esperimento di correlazione di chemical shift omonucleare attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin. La sua sequenza è costituita da due impulsi di $\pi/2$ separati da un tempo t_1 variabile, nel senso che viene fatto variare durante l'esperimento con incrementi costanti; il secondo impulso trasferisce parte della coerenza creata col primo impulso tra nuclei accoppiati scalarmente. Si avranno dunque picchi di correlazione in corrispondenza di tali nuclei, e questi picchi consentono di stabilire una rete di connessioni fra i protoni di una molecola, fornendo preziose informazioni strutturali.

Il TOCSY² (TOtal Correlation SpectroscopY), come il COSY, è un esperimento NMR bidimensionale di correlazione omonucleare, in cui però sono presenti cross peaks non solo in corrispondenza di nuclei direttamente accoppiati, ma anche tra qualunque altra coppia di protoni appartenenti allo stesso sistema di spin. La sequenza TOCSY permette infatti il trasferimento della polarizzazione di un protone a qualunque altro protone che sia ad esso collegato attraverso una serie di accoppiamenti scalari spin-spin. Nella pratica, tuttavia, non si può andare oltre i cinque-sei accoppiamenti; inoltre un accoppiamento piccolo (dell'ordine di grandezza di 2 Hz) può bloccare la serie di trasferimenti di polarizzazione. Il parametro che regola questi trasferimenti è il mixing time, Δ , il cui incremento generalmente fa aumentare il numero di correlazioni osservabili, a prezzo di una diminuzione della sensibilità dell'esperimento. L'esperimento TOCSY è utile soprattutto quando nel composto sotto esame sono individuabili una serie di piccoli sistemi di spin isolati tra loro, come accade nel caso degli oligopeptidi o degli oligosaccaridi.

Il ROESY³ (Rotating-frame Overhauser SpectroscopY) è una correlazione di chemical shift omonucleare che mette in evidenza un fenomeno, il ROE (Rotating-frame Overhauser Effect), che è simile al NOE, ma presenta rispetto a questo alcune importanti differenze. Il ROE è, come il NOE, dovuto all'accoppiamento dipolare (attraverso lo spazio) tra nuclei, e dipende quindi dalla distanza tra i nuclei; è quindi molto utile per studi stereochimici e conformazionali. Tuttavia, mentre il NOE al crescere delle dimensioni della molecola (o più esattamente al diminuire del suo tempo di correlazione τ_c) cambia di segno, passando da positivo a negativo, il ROE è sempre positivo. L'esperimento ROESY è quindi particolarmente utile per molecole medie, intorno al peso molecolare 1000, che si trovano nella zona di confine tra NOE positivo e negativo, e presentano quindi un NOE vicino a zero. Un'altro importante aspetto dell'esperimento ROESY è che esso ha una sequenza molto simile a quella del TOCSY, ed infatti spesso negli spettri ROESY sono presenti picchi di correlazione spuri dovuti a correlazioni di tipo TOCSY. Fortunatamente questi artefatti sono facilmente riconoscibili, poiché presentano fase opposta a quella

dei reali picchi ROESY. Per una corretta interpretazione dello spettro, è quindi molto importante che l'esperimento ROESY sia acquisito in modo phase-sensitive.

L'HSQC⁴ (Heteronuclear Reverse Multiple Quantum Correlation) è una correlazione bidimensionale di chemical shift eteronucleare ^1H - ^{13}C tramite la costante di accoppiamento diretta $^1J_{\text{CH}}$, caratterizzato da una sensibilità notevolmente superiore rispetto a quella dell'HETCOSY. In questo esperimento, sviluppato piuttosto recentemente, il segnale acquisito è quello protonico (reverse detection), anziché quello relativo al ^{13}C come nell'esperimento HETCOSY. Il fatto che la sensibilità NMR del protone è molto più alta di quella del ^{13}C rende l'HSQC un esperimento molto più sensibile, e quindi adatto anche a campioni disponibili in quantità limitata. L'inconveniente di questo esperimento è che, data la bassa abbondanza isotopica del ^{13}C (1.1%), solo una piccola percentuale di protoni è legata ad atomi di carbonio ^{13}C , e fornisce quindi informazioni utili, mentre il segnale relativo ai protoni legati al ^{12}C deve essere eliminato. Tuttavia, poiché quest'ultimo rappresenta la gran parte del segnale totale, la sua completa eliminazione è piuttosto

difficile, e anche una eliminazione incompleta può lasciare un segnale residuo sufficiente a nascondere tutti i picchi di correlazione. Negli spettrometri più recenti questo problema è stato risolto utilizzando impulsi di gradiente di campo magnetico, che defocalizzano il segnale non desiderato in maniera da eliminarlo. Pertanto, in un esperimento HSQC, i picchi di correlazione sono in realtà dalle bande satelliti ^{13}C del segnale protonico, e collassano a formare un unico segnale in corrispondenza del segnale protonico principale (quello dei protoni legati al ^{12}C) soltanto perché normalmente l'esperimento è registrato in presenza di disaccoppiamento ^{13}C .

L'HMBC⁵ (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) è una correlazione eteronucleare long-range, che fornisce quindi le stesse informazioni del COLOC, ma acquisito in reverse detection, con tutti i vantaggi di sensibilità che ne derivano, ma anche con il problema della soppressione del segnale dei protoni legati al ^{12}C . Tale problema è anzi acuito dalla minore intensità dei cross-peaks, dovuta a due fattori. In primo luogo, la sequenza HMBC, che sfrutta costanti di accoppiamento piccole (3-10 Hz), è intrinsecamente meno efficiente dell'HSQC. Inoltre, mentre le

$^1J_{\text{CH}}$ sono tutte simili tra loro, le $^{2,3}J_{\text{CH}}$ possono essere molto diverse, ed è quindi impossibile eseguire un esperimento ottimizzato per tutti i loro possibili valori. Anche in questo caso, la possibilità di utilizzare impulsi di gradiente di campo magnetico ha trasformato questo esperimento in un esperimento di routine.

2.4. Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica di analisi strutturale basata sull'assorbimento da parte del campione di una radiazione UV o visibile. La radiazione usata è polarizzata circolarmente, ossia il vettore campo elettrico **E** rimane sempre della stessa intensità ma ruota con frequenza pari alla frequenza della radiazione. Il risultato è che la punta del vettore percorre una traiettoria a spirale. La rotazione può naturalmente avvenire in due versi. Se guardando la sorgente della luce il vettore **E** ruota in senso orario, la luce è detta luce polarizzata circolarmente destra, se la rotazione è antioraria si parla di luce polarizzata circolarmente sinistra. Il dicroismo circolare (CD) è la differenza (ΔA) tra le assorbanza misurata usando come radiazione incidente una radiazione polarizzata circolarmente sinistra (A_S) e quella misurata usando una radiazione polarizzata circolarmente destra (A_D). In generale ogni assorbimento UV/visibile dà origine ad una banda nello spettro CD, chiamata *effetto Cotton*, il cui massimo (o il minimo per bande con segno negativo) si trova più o meno alla stessa lunghezza d'onda del

massimo di assorbimento UV/visibile (infatti uno spettro CD è un grafico del dicroismo circolare in funzione della lunghezza d'onda). Lo spettro CD è dato dalla sovrapposizione di bande positive e negative di questo genere. Il dicroismo circolare può essere usato per determinare la configurazione assoluta di una molecola, ma anche configurazioni relative e conformazioni. Poiché il dicroismo circolare è una tecnica che utilizza radiazioni elettromagnetiche asimmetriche, è intrinsecamente in grado di distinguere tra enantiomeri: due enantiomeri avranno spettri CD uguali ma di segno opposto.

L'applicazione concettualmente più semplice del dicroismo circolare è il riconoscimento di enantiomeri avendo a disposizione spettri di riferimento. Rispetto alla polarimetria, si ha il vantaggio di una sensibilità molto maggiore, e quello di disporre di un intero spettro invece che di una misura in un singolo punto, e questo permette di evidenziare più facilmente la presenza di eventuali impurezze che modificano la forma dello spettro.

Un requisito affinché una molecola possa essere studiata con il CD è naturalmente che possieda un cromoforo, ossia un

gruppo funzionale in grado di assorbire nell' UV/visibile. È comunque possibile con opportune reazioni di funzionalizzazione introdurre un cromoforo anche in molecole che non ne possiedono. Anzi, in questo modo, si ha la possibilità di introdurre il cromoforo più adatto all'esperimento che si intende effettuare. Una delle regole più importanti per stabilire la configurazione assoluta di una molecola è il metodo dell' exciton chirality. Tale metodo si basa sul fenomeno dell' exciton coupling ossia sull'accoppiamento tra i cromofori. Se i due cromofori sono uguali, il centro delle due bande corrisponde approssimativamente al massimo di assorbimento del cromoforo, mentre se i due cromofori assorbono a lunghezze d' onda diverse le due bande compaiono ognuna in corrispondenza di un cromoforo. L'utilità del metodo dell' exciton chirality deriva dal fatto che il segno dello spettro CD è collegato in maniera molto semplice alla disposizione nello spazio dei due cromofori.

2.5. Gas-cromatografia

La gas-cromatografia è un metodo di analisi chimica che consente di ottenere la separazione dei componenti di una miscela di prodotti volatili. Si basa sull'assorbimento delle sostanze da parte di solidi o liquidi supportati (fase stazionaria) e sulla differente velocità di eluizione, dei componenti della miscela assorbita, da parte di un gas detto di trasporto (fase mobile). Nell'analisi cromatografica il campione da esaminare viene introdotto nell'apposita camera dove, se liquido, viene vaporizzato; dal gas di trasporto viene fatto passare attraverso la colonna, rigorosamente termostata, di forma e di lunghezza opportune. In colonna avviene la separazione delle sostanze, che così arrivano al rivelatore in tempi diversi e vengono registrate. La registrazione fornisce un grafico in cui sono presenti i picchi caratteristici per ciascuna sostanza componente la miscela, nel senso che la distanza di ogni picco da quello usato come riferimento è, a parità di condizioni sperimentali, caratteristica di ogni sostanza. Tali distanze misurano il tempo di ritenzione dei singoli componenti. La costanza del tempo di ritenzione per le

varie sostanze permette di eseguire l'analisi qualitativa. Invece l'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di composto e perciò dalla loro misura si può eseguire l'analisi quantitativa.

2.6. Riferimenti bibliografici

1. Bax A.; "Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids", Delft University Press, Dordrecht, **1982**.
2. Davis D.G., Bax A.; *J. Am.Chem. Soc.*, **1985**, *107*, p. 2820.
3. Davis D.G., Bax A.; *J. Mag. Res.*, **1985**, *37*, p. 207.
4. Davis D.G., Bax A.; *J. Mag. Res.*, **1986**, *67*, p. 565.
5. Bax A., Summers M.F.; *J. Am. Chem.Soc.*, **1986**, *108*, p. 2093.

PARTE II

ISOLAMENTO E DETERMINAZIONE STRUTTURALE DI GLICOLIPIDI DA ECHINODERMI

3. I Glicolipidi

3.1. Introduzione

I glicolipidi rappresentano una classe di composti ampiamente diffusa nel regno animale e vegetale; essi rivestono particolare interesse per la loro variabilità chimica e biochimica e per il loro significato biologico.

I glicolipidi sono infatti componenti ubiquitari della membrana plasmatica di tutte le cellule vertebrate. Svolgono diverse ed importanti funzioni nell'ambito di un'ampia varietà di processi biologici, quali la modulazione della differenziazione cellulare e della trasduzione del segnale, e l'adesione ed il riconoscimento cellula-cellula,¹ ed inoltre posseggono un ampio spettro di attività aptenica. In virtù di queste loro proprietà, alcuni glicolipidi hanno dimostrato di avere attività sul sistema immunitario, di influenzare l'angiogenesi e di interferire con la proliferazione delle cellule tumorali. Essi possono essere quindi considerati potenziali agenti terapeutici inserendosi così nella vasta gamma di principi attivi naturali che sono alla base di molti dei farmaci attualmente in uso.

L'unico phylum i cui glicolipidi sono stati studiati estesamente è proprio quello degli echinodermi, che producono una notevole varietà di glicosidi steroidei e di glicosfingolipidi neutri (cerebrosidi) o contenenti acido sialico (gangliosidi); inoltre è noto che alcuni molluschi (principalmente del genere *Aplysia*) producono complesse miscele di fosfolipidi.

Da un punto di vista strutturale, i glicolipidi sono molecole anfifiliche: infatti essi sono glicoconiugati che posseggono una o più unità monosaccaridiche legate tramite un legame glicosidico ad un aglicone di natura lipidica, quindi idrofobica, che può essere, ad esempio, un acilglicerolo, un ceramide, o un'unità di prenil fosfato².

Per queste loro caratteristiche, i glicolipidi sono importanti fattori di stabilizzazione delle membrane plasmatiche, poiché la porzione lipidica si inserisce nel bilayer fosfolipidico influenzandone così la fluidità e la stabilità (soprattutto nelle membrane fotosintetiche di piante superiori ed alghe); la porzione zuccherina, invece, di natura polare, è rivolta verso l'esterno delle cellule e sembra essere responsabile dell'attività biologica³ (fig 3.1).

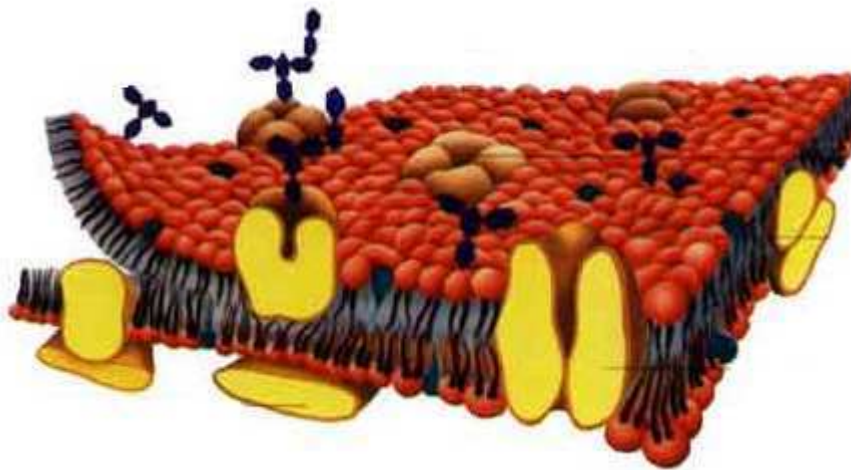


Figura 3.1. Bilayer fosfolipidico

Sebbene la catena zuccherina sia sicuramente la maggiore responsabile del significato biologico dei glicolipidi, attualmente essi sono classificati in base alle differenze della parte lipidica.

Se ne distinguono, in base a tale classificazione, 5 tipi⁴:

- a.** derivati sfingosinici (cerebrosidi, sulfatidi, citosidi, gangliosidi)
- b.** esteri di carboidrati con acidi grassi
- c.** glicolipidi steroidei
- d.** glicolipidi poliisoprenoidici
- e.** glicoglicerolipidi

Nella presente tesi si riporta l'isolamento, la determinazione strutturale e l'attività biologica di diversi glicolipidi provenienti da varie specie di echinodermi.

Praticamente in tutti i casi i metaboliti studiati erano presenti negli organismi in piccole quantità, e spesso è stato possibile isolarne solo qualche milligrammo. Per questo, la determinazione strutturale non ha potuto che basarsi su tecniche spettroscopiche, tra le quali va ricordata la spettrometria di massa, ma soprattutto la risonanza magnetica nucleare (NMR). Si è fatto un uso molto esteso delle tecniche NMR bidimensionali, sia omonucleari che eteronucleari, impiegando gli esperimenti più moderni al momento disponibili. Molto spesso l'insieme dei dati forniti da queste tecniche è stato sufficiente a determinare completamente le strutture, altre volte sono state necessarie tecniche NMR particolari oppure trasformazioni chimiche dei composti sotto esame. In particolare, l'analisi della porzione lipidica dei glicolipidi ha richiesto quasi sempre qualche tipo di degradazione chimica, e sono state messe a punto varie metodiche di degradazione chimiche su

piccolissima scala (100-500 μg) per preservare il campione per i successivi saggi biologici.

3.2. Tecniche di isolamento

Nelle loro linee generali, l'isolamento e la purificazione dei glicolipidi non si discostano da quelli degli altri prodotti naturali, che vengono effettuati basandosi principalmente su tecniche cromatografiche. Tuttavia, c'è un aspetto particolare che deve essere preso in considerazione al momento di progettare una strategia di purificazione: la maggior parte dei glicolipidi naturali è presente negli organismi che li producono sotto forma di miscele, anche molto complesse, in cui i vari componenti differiscono per la lunghezza delle catene alchiliche, o anche per la presenza o assenza di ramificazioni metiliche nelle stesse catene. Non è difficile trovarsi di fronte a miscele di glicolipidi con 7-8 sfingosine e altrettanti acidi grassi diversi: una miscela del genere può essere composta da oltre 50 composti differenti.

Questo rende difficile, e spesso impossibile, l'isolamento in forma pura di tutti i componenti della miscela; anche se in letteratura sono riportati esempi di separazione di miscele complesse di glicolipidi per HPLC su colonne di silice RP-18,^{5,6} soltanto un piccolo numero dei picchi del cromatogramma è

dovuto prodotti puri. D'altra parte, come già detto precedentemente, è ormai riconosciuto che l'attività biologica dei glicolipidi dipende principalmente dalla natura della parte zuccherina della molecola, mentre la parte lipofila serve ad ancorare la molecola nella membrana cellulare: non è azzardato affermare che glicolipidi che differiscono solo per un metilene in una catena alchilica, o per una ramificazione metilica, da un punto di vista biologico possano essere considerati lo stesso composto.

Per questo, le procedure di purificazione impiegate per la purificazione dei glicolipidi hanno portato spesso all'ottenimento di miscele, omogenee per quanto riguarda la parte polare della molecola, e con catene alchiliche lipofile simili. Una miscela del genere è perfettamente adeguata per uno studio mediante NMR, poiché i segnali di tutti i componenti della miscela sono praticamente coincidenti (soltanto la risonanza dei metili terminali è differente nel caso in cui la miscela contenga composti sia con catene iso che con catene lineari). Dopo la determinazione della struttura della parte polare della molecola, l'esatta natura e proporzione delle varie catene alchiliche presenti

è stata stabilita mediante degradazione di una piccola quantità del campione.

L'esperienza via via accumulata nell'isolamento di glicolipidi ha consentito la messa a punto di una strategia generale di purificazione adatta a tutti i glicolipidi neutri (Figura 3.2), che si basa sulle loro caratteristiche anfifiliche. L'estratto metanolico e cloroformico degli organismi, che consiste di una miscela complessa contenente quasi tutti i metaboliti a basso peso

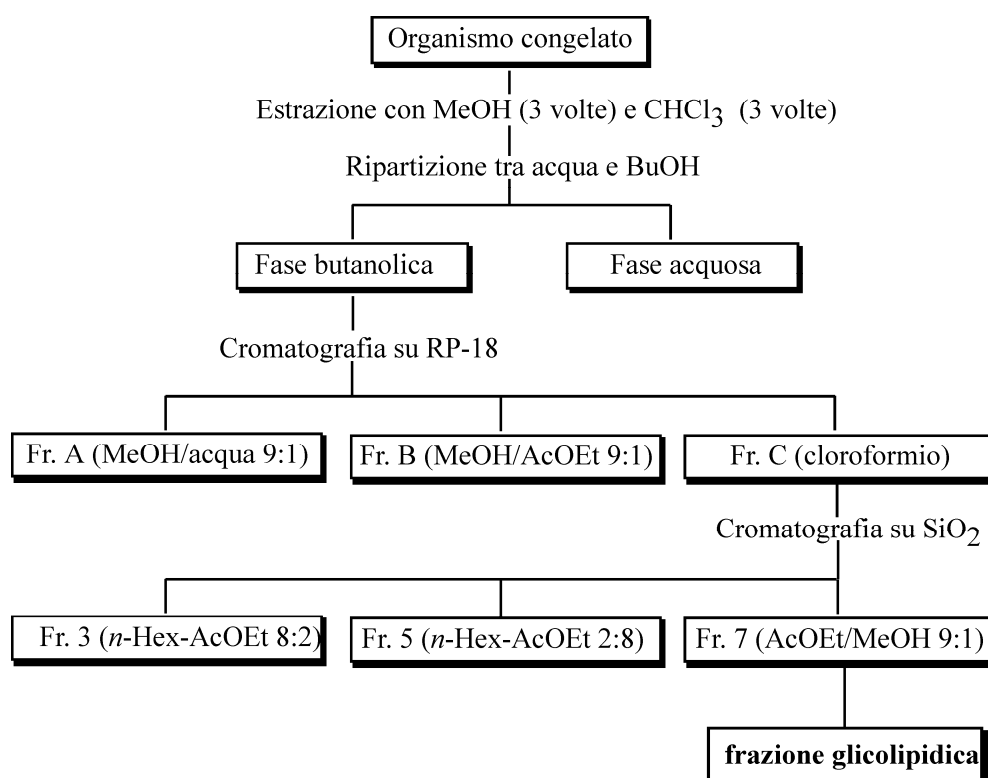


Figura 3.2. Schema di isolamento dei glicolipidi neutri

molecolare dell'organismo sotto esame, è sottoposto innanzitutto a separazione cromatografica su silice a fase inversa RP-18, che trattiene fortemente i glicolipidi per le loro catene alchiliche apolari, e poi su silice non funzionalizzata, che invece interagisce con l'estremità polare della molecola; in questo modo si può ottenere una frazione glicolipidica relativamente pura.

Tale procedura, per quanto sia stata largamente sperimentata ed utilizzata con successo per l'isolamento di glicolipidi neutri, non permette però il recupero di un particolare tipo di glicosfingolipidi acidi da noi ricercati negli organismi analizzati, ossia dei gangliosidi. Nel capitolo 5 verrà descritta nel dettaglio la metodica messa a punto appositamente per l'isolamento di miscele contenenti quasi esclusivamente gangliosidi a partire da miscele complesse come appunto estratti di organismi marini.

In ogni caso, una volta ottenuta la miscela glicolipidica da separare, per quanto riguarda i passi successivi della separazione, non esiste una strategia universalmente valida, ma la procedura va ottimizzata per il singolo composto. In molti casi è stato preferibile acetilare l'intera miscela, poiché i glicolipidi acetilati possono essere facilmente separati per HPLC su silice

non funzionalizzata con eluenti poco polari (miscele di *n*-esano ed AcOEt oppure *i*-PrOH). La reazione di acetilazione è facilmente reversibile se il glicolipide naturale non contiene legami esterei (come nel caso dei glicosfingolipidi), e per di più il glicolipide acetilato è particolarmente adatto all'analisi strutturale mediante NMR. Inoltre, l'acetilazione con anidride acetica deuterata (CD₃CO)₂O permette di distinguere tra i gruppi acetilici introdotti con l'acetilazione e quelli eventualmente già presenti nel prodotto naturale.

In altri casi è stato necessario lavorare, in alcune fasi della separazione, sui composti non acetilati; in questo caso è ancora possibile effettuare separazioni HPLC su colonne di silice, ma utilizzando eluenti molto più polari (come miscele di AcOEt e *i*-PrOH oppure di CHCl₃ e *i*-PrOH).

3.3. Riferimenti bibliografici

1. V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, M. Di Rosa, A. Ianaro, P. Maffia, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 1573-1578.
2. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Eur. J. Biochem*, **1998**, 257-293
3. E. Fattorusso, A. Mangoni in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Eds.: W. Hertz, G.W. Kirby, R. E. Moore, W. Steiglich, Ch. Tamm), Springer-Verlag, Wien, **1997**, 215-247.
4. Morrison I. M.: The glycolipids and gangliosides, in *Carbohydrate Chemistry*; J.F.Kennedy Ed.; Clarendon Press Inc.: Oxford, **1988**, p.196.
5. R. Higuchi, T. Natori, T. Komori, *Liebigs Ann. Chem*, **1994**, p.51.
6. R. Higuchi, M. Inagaki, K. Togawa, T. Miyamoto, T. Komori, *Liebigs Ann. Chem*, **1994**, p.545.

4. I Glicosfingolipidi

4.1. Introduzione

I glicosfingolipidi (GSL) sono molecole in cui una catena mono o oligosaccaridica ed un acido grasso sono legati ad un amminoalcol a lunga catena detto base sfingoide o base a lunga catena (long-chain base, LCB). L'acido grasso è legato all'LCB tramite un legame ammidico, e l'insieme di questi due residui costituisce una *N*-acilsfingosina che viene detta ceramide; la catena saccaridica è legata, tramite un legame *O*-glicosidico, alla funzione alcolica primaria del ceramide (Figura 4.1).

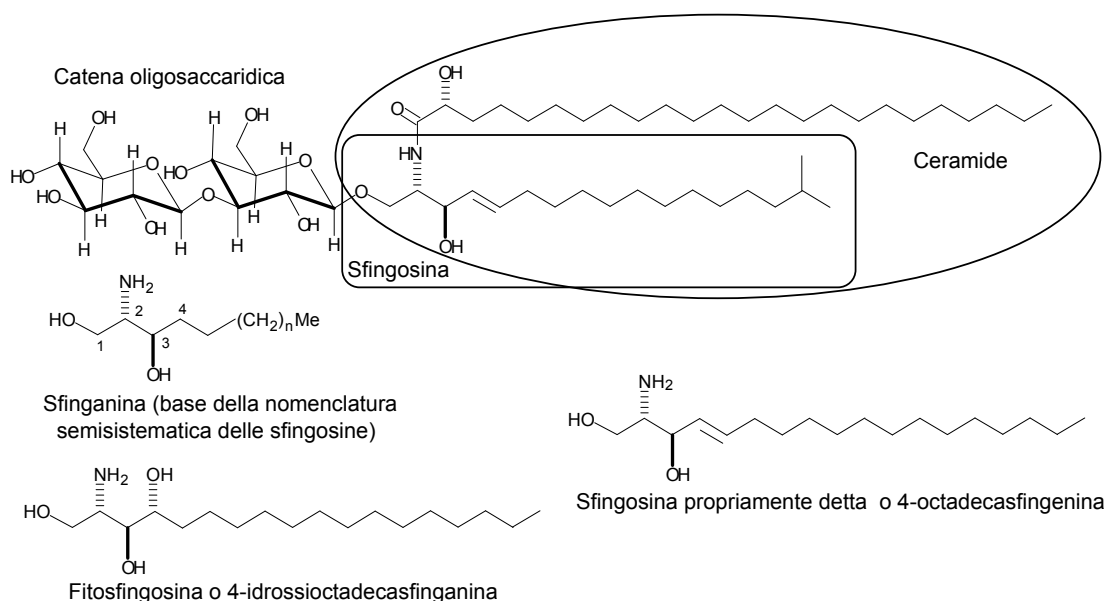


Figura 4.1. Struttura di un generico glicosfingolipide

La sfingosina è la base a lunga catena che comunemente si ritrova negli animali superiori: pertanto, nella maggior parte dei casi, quando si parla di LCB, ci si riferisce alla sfingosina. Nei glicolipidi di origine vegetale, invece, si ritrova frequentemente una LCB triidrossilata detta fitosfingosina; anche in questo caso, il termine fitosfingosina è utilizzato in maniera più generale per indicare qualsiasi LCB triidrossilata. Siccome negli ultimi anni è stato descritto in letteratura un numero crescente di differenti basi sfingoidi, è stata proposta per le basi sfingoidi una nomenclatura semisistematica basata sul 2-ammino-1,3-ottadecandiolo o sfinganina.¹

Lo studio dei GSL si è sviluppato inizialmente con l'analisi della composizione chimica del cervello e dei centri nervosi degli animali superiori; infatti, i GSL sono particolarmente abbondanti nei tessuti del sistema nervoso. È disponibile un numero sempre maggiore di evidenze del fatto che i GSL, insieme alla sfingomielina ed al colesterolo, siano inclusi in microdomini, detti clusters, coinvolti in diversi processi di membrana,²⁻⁴ come la trasduzione del segnale e l'internalizzazione di batteri e virus. Successivamente, negli

anni, da fonti naturali sono stati isolati più di 200 differenti glicosfingolipidi, che mostrano una notevole varietà strutturale: glucosio, galattosio, fucosio, *N*-acetilgalattosammina, *N*-acetilglucosammina, arabinosio ed acido sialico sono solo alcuni degli zuccheri che sono stati ritrovati nei glicosfingolipidi; inoltre la parte zuccherina può essere lineare o ramificata ed i gruppi ossidrilici dello zucchero sono spesso metilati, acetilati, fosforilati o solfonati. Nonostante queste diversità, tutti i glicosfingolipidi naturali possono essere classificati in poche grandi classi sulla base dei primi due o tre zuccheri della catena oligosaccaridica, e tutti condividono di gran lunga la stessa struttura di base, vale a dire un ceramide glicosilato da un esoso in forma piranosica. Il primo residuo zuccherino è generalmente un β -glucosio o, molto più raramente, un β -galattosio. L'analisi chimica dei poriferi ha inoltre portato alla scoperta di una nuova classe di GSL, gli α -galattosilglicosfingolipidi (α -Gal-GSL), caratterizzati dalla presenza di un α -galattosio come primo zucchero della catena oligosaccaridica; questa caratteristica strutturale non è mai stata ritrovata nei GSL di nessun'altra classe di organismi viventi.

4.2. Metodi generali di determinazione strutturale

Fino a non molti anni fa, la determinazione strutturale dei GSL era effettuata mediante degradazione chimica: la composizione in monosaccaridi era stabilita mediante idrolisi, e i legami tra gli zuccheri mediante metanolisi del glicolipide permetilato. La disponibilità delle moderne tecniche NMR mono e bidimensionali ha rivoluzionato questo approccio, e così la struttura dei GSL isolati è stata stabilita principalmente sulla base di dati NMR. In questo modo è stato possibile determinare la struttura di GSL disponibili in quantità molto limitata, ed in maniera non distruttiva, in modo da preservare il campione per i successivi saggi biologici.

4.2.1 Struttura della catena oligosaccaridica.

La struttura, ad eccezione della configurazione assoluta, della parte zuccherina di tutti i composti isolati è stata stabilita esclusivamente sulla base di esperimenti NMR. Si sono utilizzati principalmente esperimenti bidimensionali di correlazione omonucleare ^1H - ^1H ed eteronucleare ^1H - ^{13}C , piuttosto che l'analisi

dei chemical shift ^{13}C spesso utilizzata nello studio di oligosaccaridi, poiché quest'ultima richiede il confronto con spettri di riferimento, non disponibili nel nostro caso per la novità delle strutture in esame.

La maggior parte degli esperimenti NMR sui GSL è stata effettuata sui derivati peracetilati dei composti in esame, ottenuti per acetilazione delle varie miscele in esame con Ac_2O /piridina. Il vantaggio di questa semplice derivatizzazione è duplice. Innanzitutto, lo spettro ^1H NMR dei GSL peracetilati presenta una dispersione dei segnali molto maggiore, e quindi una minore probabilità di sovrapposizione dei segnali, il che facilita la lettura e l'assegnazione delle risonanze. La maggiore dispersione è originata dal fatto che i segnali dei protoni relativi a ossimetini acetilati risuonano a campi notevolmente più bassi (δ 4.7-5.7) rispetto a quelli liberi o impegnati in legami eterei (δ 3.5-4.5). Un analogo, anche se più limitato, shift verso campi bassi si verifica per gli ossimetileni acetilati. Inoltre, lo spostamento a campi bassi, in seguito ad acetilazione, della risonanza di un protone fornisce un semplice ed inequivocabile mezzo per

distinguere gli ossidrili liberi da quelli impegnati in legami eterei e glicosidici.

La strategia seguita per la determinazione della struttura della catena oligosaccaridica prevede l'analisi sequenziale dei dati acquisiti mediante una serie di esperimenti NMR bidimensionali. Un utile punto di partenza è lo spettro di correlazione eteronucleare ^1H - ^{13}C HSQC, che consente la facile identificazione dei carboni e quindi dei protoni anomerici, dando subito una informazione chiave: il numero delle unità saccaridiche. Successivamente, lo spettro TOCSY permette di identificare i protoni di ogni sistema di spin a partire dal corrispondente protone anomero o da qualunque altro protone isolato; è da ricordare, comunque, che una costante di accoppiamento piccola (come quella, per esempio, per esempio tra H-4 e H-5 di un galattosio) può bloccare il trasferimento di coerenza nel TOCSY. Un successivo esperimento COSY stabilisce la sequenza dei protoni all'interno di ogni singolo sistema di spin. Già a questo punto, i chemical shift dei protoni permettono di stabilire se lo zucchero è in forma di furanosio o piranosio, e se ci sono ossidrili glicosilati.

La natura degli zuccheri e la configurazione del legame glicosidico sono poi stabilite mediante analisi delle costanti di accoppiamento, particolarmente utile nel caso di piranosio, in cui le $J_{\text{ax-ax}}$ sono ben distinguibili dalle $J_{\text{ax-eq}}$ e $J_{\text{eq-eq}}$. Infatti il ciclo a sei termini di uno zucchero in forma piranosica assume una conformazione a sedia, e normalmente una delle due possibili sedie è molto favorita rispetto all'altra (per gli esosi è quella con il CH_2OH equatoriale). Di conseguenza, diventa piuttosto agevole distinguere i protoni in posizione assiale da quelli in posizione equatoriale sulla base delle loro costanti di accoppiamento: infatti la costante di accoppiamento tra due protoni assiali è molto più grande (9-14 Hz) di quella tra un protone assiale e un protone equatoriale, o tra due protoni equatoriali (0-5 Hz). In generale, se un protone ha almeno una costante di accoppiamento vicinale grande, sarà sicuramente assiale; non vale il contrario, perché un protone che ha solo costanti di accoppiamento vicinali piccole può ancora essere assiale.

Tuttavia parlare di analisi delle costanti di accoppiamento presuppone che le costanti di accoppiamento siano state

misurate. Questa misura non è sempre facile in glicolipidi complessi, poiché la sovrapposizione dei segnali impedisce di leggere le costanti direttamente esaminando la molteplicità dei segnali.

Una possibilità alternativa per misurare le costanti di accoppiamento consiste nell'utilizzo dello spettro 2D NMR HSQC. Quello che risulta di fondamentale importanza per i nostri scopi è che nello spettro HSQC il picco di correlazione conserva la molteplicità del segnale dello spettro NMR protonico a cui si riferisce, ed è quindi possibile esaminare la molteplicità del segnale e misurare le costanti di accoppiamento protone-protone. Se ognuno dei protoni che si sovrappongono nello spettro protonico è legato ad un carbonio che ha chemical shift diverso, i loro picchi di correlazione non saranno sovrapposti e quindi non sarà un problema osservare la loro molteplicità. Per osservare queste molteplicità, è però necessario che la risoluzione digitale dell'esperimento sia sufficientemente alta nella dimensione protonica.

Per quanto riguarda i legami interglicosidici, le posizioni in cui ogni zucchero è glicosilato sono dedotte, come detto sopra,

dall'analisi dei chemical shift protonici, mentre lo zucchero glicosilante è individuato ancora grazie allo spettro ROESY e/o mediante usare esperimenti NMR bidimensionali di correlazione long-range ^1H - ^{13}C (HMBC).

4.2.2 Principali esperimenti NMR utilizzati.

L'esperimento bidimensionale COSY ha consentito di determinare le sequenze dei protoni all'interno dei sistemi di spin precedentemente individuati per ogni zucchero, nonché di identificare i protoni della parte polare del ceramide.

La sequenza di impulsi nell'esperimento bidimensionale di correlazione ^1H - ^1H TOCSY ha consentito il trasferimento di coerenza attraverso uno o più (di solito fino a 5-6) accoppiamenti spin-spin; in questo modo, qualsiasi coppia di protoni appartenenti allo stesso sistema di spin può dare origine ad un picco di correlazione. Questo esperimento è particolarmente utile in molecole dove sono presenti molti sistemi di spin separati, come per esempio nelle catene oligosaccaridiche, ed è stato utilizzato per identificare i protoni

di ogni zucchero, normalmente sulla base dei loro picchi di correlazione con il protone anomero.

I dati forniti dagli esperimenti ROESY hanno permesso di individuare le posizioni di glicosilazione, e la stereochimica dei centri chirali degli zuccheri nel caso le informazioni fornite dall'analisi delle costanti di accoppiamento non fossero state sufficienti.

L'esperimento HSQC è stato particolarmente utile per identificare i protoni anomerici, poiché nei glicolipidi peracetilati questi risuonano a chemical shift simili a quelli degli altri protoni dello zucchero, mentre i rispettivi carboni anomerici risuonano a chemical shift molto caratteristici, e sono quindi facilmente riconoscibili. L'esperimento HSQC è stato anche utile per identificare facilmente i protoni diastereotopici dei metileni in 6 degli esosi ed in 5 dei pentosi, che risultano ovviamente accoppiati allo stesso carbonio.

L'esperimento di correlazione eteronucleare ^1H - ^{13}C attraverso due o tre legami (HMBC) è molto utile nella determinazione strutturale di molecole organiche perché permette di superare l'ostacolo costituito dalla presenza di atomi di carbonio non

protonati. Purtroppo questo esperimento ha una sensibilità inferiore a quella degli altri esperimenti discussi finora (comunque con 2-3 mg di GSL è possibile ottenere uno spettro utilizzabile), e per di più non tutte le correlazioni attese sulla base della struttura risultano visibili, poiché il range di valori che le $^{2,3}J_{CH}$ possono assumere è piuttosto ampio, ed è quindi impossibile ottimizzare l'esperimento per tutti i possibili valori delle costanti. Questo esperimento è stato utilizzato, quando la quantità di campione era sufficiente, in aggiunta al ROESY per identificare le posizioni di glicosilazione e l'ordine degli zuccheri nella catena saccaridica.

4.2.3 Struttura del ceramide.

Per la determinazione della struttura della parte ceramidica dei GSL studiati si è ricorsi invece, nelle maggior parte dei casi, a tecniche che prevedono la degradazione di una piccola quantità di composto, sia per la presenza contemporanea nei campioni esaminati di catene alchiliche differenti, sia perché lo spettro NMR di catene alchiliche di lunghezza diversa è praticamente identico, mentre uno spettro di massa ESI non permette di

distinguere tra catene lineari e ramificate. Tuttavia, anche in questo caso, lo studio NMR è stato indispensabile per stabilire la struttura e la stereochimica relativa della parte polare delle sfingosine, oltre che per individuare le ramificazioni delle catene alchiliche.

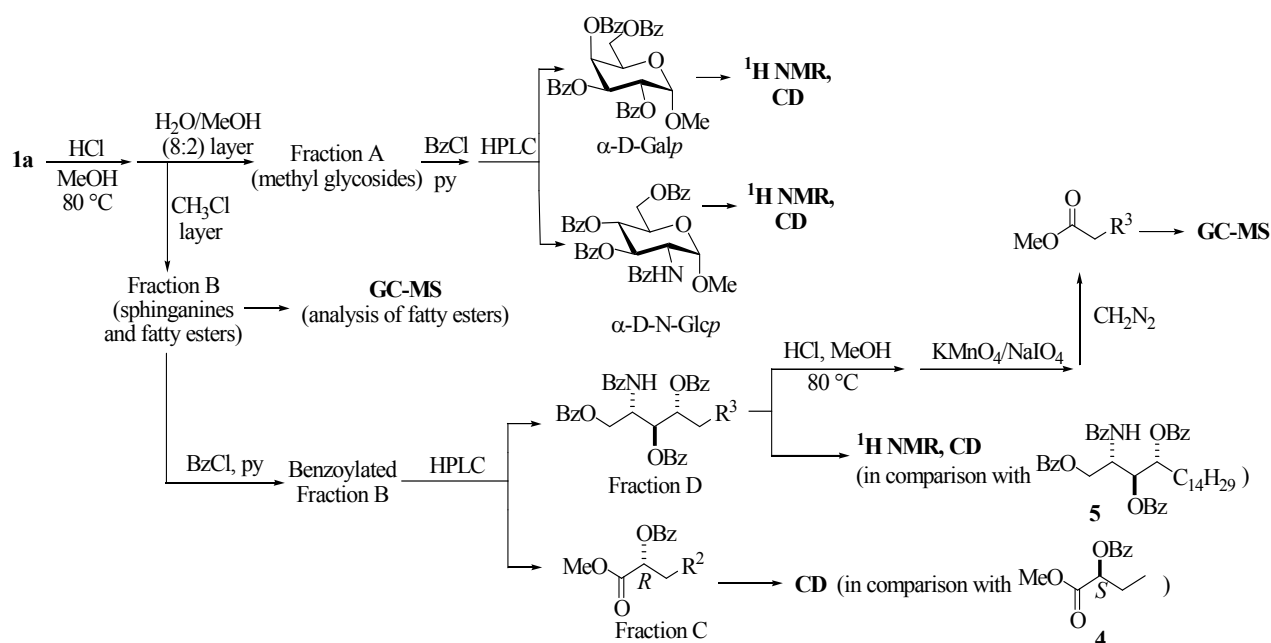


Figura 4.2. Schema di degradazione dei GSL per la determinazione della struttura del ceramide

L'approccio seguito (Figura 4.2) prevede la metanolisi acida del GSL con HCl in MeOH, e la successiva separazione della miscela di reazione mediante ripartizione tra CHCl₃ e H₂O/MeOH (8:2). Questa separazione permette di ottenere una fase acquosa contenente i metil glicosidi (frazione A), ed una

fase organica contenente sfinganine e gli esteri metilici degli acidi grassi (frazione B). Questa frazione è analizzata per GC-MS per separare ed identificare gli esteri metilici degli α -idrossiacidi. Per quanto riguarda le sfinganine, i loro perbenzoil derivati (Frazione D, vedi il paragrafo successivo) utilizzati per l'analisi CD sono poi sottoposti a metanolisi seguita da degradazione ossidativa con $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$. Si ottengono acidi grassi con 3 atomi di carbonio in meno, che sono poi metilati con diazometano ed identificati per GC-MS.

4.2.4 Configurazione assoluta.

Ogni volta che viene effettuata la degradazione di una sufficiente quantità di GSL, i prodotti ottenuti potrebbero anche essere utilizzati per determinare la configurazione assoluta della molecola attraverso misure di potere ottico rotatorio. Per le sfinganine e gli α -idrossiacidi si possono utilizzare le rispettive miscele; la frazione di metilglicosidi, dopo acetilazione, può essere separata per HPLC a fasi inverse, e la stereochimica assoluta dei metilglicosidi isolati potrebbe essere poi stabilita per confronto del potere ottico rotatorio dei metilglicosidi puri così

ottenuti con quello di metilglicosidi ottenuti da campioni autentici di zucchero.

Tuttavia, poiché la scarsa sensibilità delle misure polarimetriche richiede la degradazione di una quantità eccessiva di campione, sono stati messi a punto metodi per determinare la stereochimica assoluta di sfingosine, α -idrossiacidi e metilglicosidi attraverso misure di dicroismo circolare. La stereochimica assoluta degli zuccheri può essere facilmente stabilita dallo spettro CD dei perbenzoilderivati dei metilglicosidi ottenuti dalla metanolisi, che possono essere facilmente separati tra loro per HPLC (poiché l'orientazione relativa dei cromofori benzoato non dipende dalla stereochimica del legame glicosidico, lo spettro CD dei perbenzoil α - e β -metilglicosidi dello stesso zucchero è praticamente identico).

Per quanto riguarda le sfingosine e gli α -idrossiacidi, la Frazione B viene benzoilata con cloruro di benzoile in piridina, ed il prodotto perbenzoilato viene separato attraverso HPLC su gel di silice, per separare gli esteri metilici dei 2-benzoilossiacidi (frazione C) dalle sfinganine perbenzoilate (frazione D). Il confronto degli spettri CD ed $^1\text{H-NMR}$ delle frazioni C e D con

quelli di campioni autentici di esteri metilici di 2-(*R*)-benzoilossiacidi e di *D-ribo*-fitosfingosina perbenzoilata consente di assegnare la stereochimica relativa ed assoluta della porzione ceramidica.

4.3. Riferimenti bibliografici

1. C.C. Sweeley: Sphingolipids In: *New Comprehensive Biochemistry* (D.E. Vance and J. Vance, eds.), Vol. 20, Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, **1991**, p.327, Amsterdam: Elsevier.
2. T. Harder, K. Simons, *Curr. Op. Cell. Biol.*, **1997**, 9, p.534.
3. S.I. Hakomori, S. Yamamura, K. Honda, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1998**, 1, p.845.
4. N.M. Hooper, *Curr. Biol.*, **1998**, 8, p.114.

5. Gangliosidi

5.1. Introduzione

I glicosfingolipidi possono essere divisi in due gruppi: glicosfingolipidi neutri e glicosfingolipidi acidi. I glicosfingolipidi acidi, a pH fisiologico, posseggono una o più cariche negative che derivano dalla presenza in queste molecole di acidi sialici, acidi uronici, gruppi solfato, gruppi fosfato o gruppi fosfonato.

Tra i glicosfingolipidi acidi ritroviamo i gangliosidi, caratterizzati dalla presenza, all'interno della catena oligosaccaridica, di uno o più residui di acido sialico, un amminochetoso acido per la presenza di un gruppo carbossilico in posizione 1; tali residui di acido sialico sono spesso legati all'ossigeno in posizione 3, 4 o 6 di un residuo di galattosio o di N-acetilgalattosammina¹ (Fig 5.1).

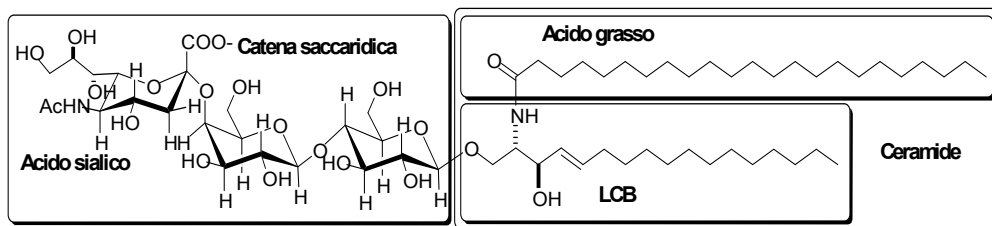


Figura 5.1. Struttura generale di un ganglioside

I gangliosidi sono stati ritrovati in vari tipi di tessuti di tutti i vertebrati terrestri. Tra gli animali marini, sono stati isolati sinora solo da invertebrati marini appartenenti al phylum Echinoderma (ricci di mare, stelle di mare, oloturie); in questo tipo di organismi, sembra che essi fungano da strutture di riferimento nelle interazioni cellulari collegate alla riproduzione.²

Questi composti sono in genere collocati nelle cellule a livello della membrana plasmatica, con la loro parte lipidica immersa nella membrana cellulare, e la loro parte zuccherina rivolta verso l'esterno della membrana. Tuttavia, essi sono stati identificati anche come componenti delle membrane citosoliche di alcune cellule del sistema endocrino.³

Nei mammiferi i gangliosidi sono particolarmente abbondanti a livello delle cellule neuronali; nel sistema nervoso, la loro

composizione è differente tra il sistema nervoso periferico ed il sistema nervoso centrale.⁴ Essi non solo contribuiscono a numerose delle funzioni fisiologiche delle cellule neuronali,⁵ ma sono anche coinvolti in molte patologie a carico del sistema nervoso: ad esempio, è stato dimostrato che i gangliosidi fungono da antigeni per gli anticorpi prodotti in alcuni processi autoimmuni che colpiscono il sistema nervoso. Inoltre, si stanno accumulando sempre più numerose prove sperimentali che dimostrano che questi composti rappresentano dei fattori neurotrofici e neuroregolatori sia *in vitro* che *in vivo*;⁶⁻⁸ i promettenti risultati ottenuti da studi effettuati su animali hanno condotto a diverse sperimentazioni cliniche su umani per testarne l'efficacia nel trattamento di alcune neuropatie periferiche e di vari disordini nervosi spinali.⁹

Oltre al sistema nervoso in cui sono particolarmente abbondanti, in ogni caso, è noto che i gangliosidi rivestono un ruolo cruciale in numerose funzioni biologiche, sia fisiologiche che associate a patologie^{10,11}: ad esempio, i recettori collegati a canali ionici sono generalmente modulati dai gangliosidi: sinora per cinque sottotipi di recettori per fattori di crescita o ormoni è

stata dimostrata una suscettibilità nei confronti di vari tipi di glicosfingolipidi sialilati.

La modulazione della risposta linfocitaria ai mitogeni ed agli antigeni indotta dai gangliosidi *in vitro* ha condotto inoltre all'ipotesi che questi agiscano da immunomodulatori *in vivo*.¹² L'impressione generale è che i gangliosidi esogeni siano responsabili della soppressione di numerose funzioni del sistema immunitario, sebbene siano talvolta osservati effetti opposti, dipendenti dalla struttura e dalla concentrazione dei gangliosidi e dalla natura delle cellule target e delle cellule effettrici. Ad esempio, è stato dimostrato che i gangliosidi sono in grado di modulare la citotossicità delle cellule natural killer (NK).^{13,14} Inoltre, questi composti possono anche fungere da autoantigeni in disordini autoimmuni, come ad esempio avviene nel diabete autoimmune.³

I gangliosidi che presentano un acido sialico come residuo terminale della catena oligosaccaridica hanno anche dimostrato di essere degli importanti siti di riconoscimento per i virus, e di essere capaci di mediare il loro ingresso all'interno delle cellule; inoltre, è anche stata provata un'interazione di alcuni tipi di

gangliosidi con varie tossine batteriche, tra le quali quella più estesamente studiata è la tossina del colera.¹⁵

Infine, un'espressione alterata di gangliosidi è anche una caratteristica comune alla maggior parte dei tumori, e provoca un'alterazione dei processi di adesione cellulare, favorendo la formazione di metastasi e l'invasività delle cellule tumorali.

In generale, è possibile affermare che i gangliosidi esercitano importanti funzioni in molti dei processi che riguardano l'interazione tra la superficie cellulare e l'ambiente pericellulare, e che pertanto essi possono quindi influenzare processi biologici anche molto complessi. Nel paragrafo successivo verrà descritta in maniera particolare l'influenza che i gangliosidi esercitano nel processo angiogenico.

5.2. Influenza dei gangliosidi nel processo angiogenico

Nell'ultima decade sono state sviluppate nuove strategie terapeutiche antitumorali, legate alla definizione di nuove forme di immunoterapie, alla neutralizzazione di specifici fattori di crescita tumorale, alla terapia genica e all'inibizione dell'angiogenesi:¹⁶ diversi tipi di tumori, infatti, sono correlati al fenomeno dell'angiogenesi.

Il processo di angiogenesi prevede la crescita di nuovi capillari da vasi preesistenti e avviene attraverso la dissoluzione della membrana del vaso originale, migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali e formazione di un nuovo tubo vascolare. Normalmente nei mammiferi adulti il sistema vascolare è in uno stato quiescente, eccetto che per gli ordinari processi come quelli coinvolti nel ciclo di riproduzione femminile. In risposta ad appropriati stimoli, le cellule endoteliali possono divenire attive e provocare la formazione di nuovi capillari.

Numerose molecole sono coinvolte nella regolazione fine del processo di angiogenesi. Sebbene le modalità di cooperazione tra

tutte queste molecole non sono state ancora completamente chiarite, è indubbio che, in condizioni fisiologiche, l'interazione coordinata tra i vari fattori coinvolti consente lo sviluppo armonico di una rete di neovasi funzionalmente efficiente. Contrariamente ai vasi che si formano in condizioni fisiologiche, i neovasi tumorali sono altamente disorganizzati, tortuosi, dilatati, con eccessive diramazioni e shunts. Conseguentemente il flusso ematico all'interno del tumore risulta caotico e variabile, comportando la presenza di vaste aree ipossiche e talvolta necrotiche.

Diversi studi clinici hanno dimostrato che l'angiogenesi è un processo essenziale per la crescita di tumori solidi; inoltre, è stato dimostrato che la soppressione di una delle fasi dell'angiogenesi inibisce la formazione di nuovi vasi, influenzando così sulla crescita del tumore e la generazione di metastasi.

E' noto che esistono già in fase avanzata di sperimentazione numerose molecole che interferiscono a vari livelli nel processo di angiogenesi, impedendo la formazione di neovasi e quindi la crescita tumorale, e non è escluso che possano esistere delle

sinergie tra le varie molecole note e fondamentali interazioni con molecole non ancora note.

Tra le sostanze naturali di natura non peptidica o proteica, i gangliosidi sono i composti più direttamente coinvolti nel processo angiogenetico. Studi recenti hanno dimostrato che l'angiogenesi può essere stimolata o repressa variando il rapporto tra G_{M3} e G_{D3} (Fig.5.2), che sono due gangliosidi presenti normalmente nei tessuti di organismi adulti. Infatti, esperimenti condotti in vivo sulla cornea di ratto^{17,18} hanno mostrato che in questi tessuti l'angiogenesi, indotta mediante la somministrazione di prostaglandine, viene repressa aumentando la concentrazione di G_{M3} , mentre al contrario viene stimolata aumentando la concentrazione di G_{D3} e G_{M1} .

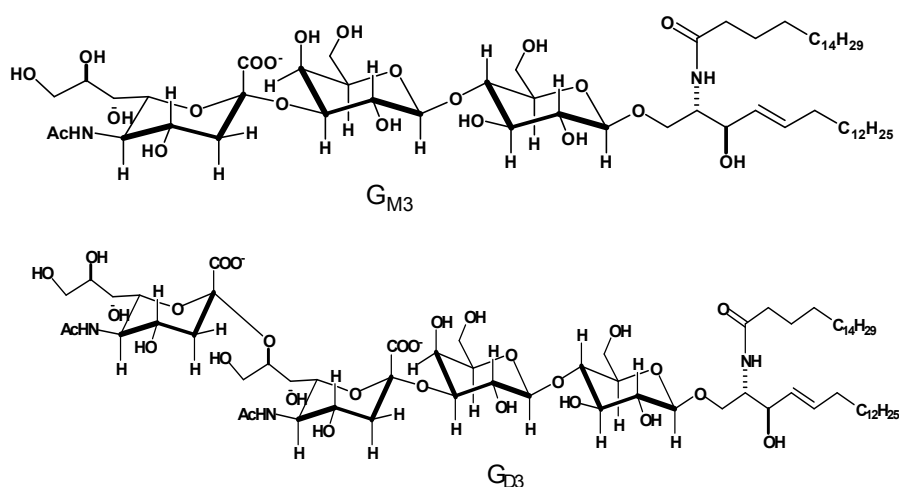


Figura 5.2. I gangliosidi G_{M3} e G_{D3}

Successivamente, la capacità dei gangliosidi di intervenire nel processo angiogenetico è stata dimostrata in diversi sistemi sperimentali: il ganglioside G_{D1a} aumenta il responso al VEGF delle cellule epiteliali della vena ombelicale umana (HUVEC cells);¹⁹ il rapporto tra G_{M3} e gangliosidi complessi influenza la crescita e le proprietà angiogeniche del tumore al cervello;²⁰ i gangliosidi G_{M1} e G_{M2} inibiscono, ma il ganglioside G_{M3} aumenta, la mitogenesi bFGF-indotta, e questo a concentrazioni pari a quelle normalmente osservate nel siero di pazienti ammalati di cancro.²¹

5.3. Nuova metodica di isolamento di gangliosidi

Lo studio riguardante i gangliosidi ed il processo di angiogenesi è attualmente ostacolato dalla difficoltà di ottenere quantità sufficienti di questi composti in forma pura. Solo pochi gangliosidi sono disponibili commercialmente, ed a costi molto elevati. Gli altri devono essere isolati direttamente dai tessuti, spesso con procedure laboriose e che comunque sono in grado di fornire solo piccole quantità di prodotto.

Gli organismi marini possono costituire una fonte alternativa per questa classe di glicolipidi. Alcune specie di echinodermi contengono grandi quantità di gangliosidi, di struttura molto simile quelli contenuti nei tessuti dei mammiferi.²² Per esempio, la stella di mare *Asterias amurensis* contiene il ganglioside G_{AA-6} ,²³ che differisce dal ganglioside G_{M3} (capace di reprimere l'angiogenesi) soltanto per la presenza di due ossidrili in più sul ceramide, ed è presumibile che anche il G_{AA-6} abbia una attività simile.

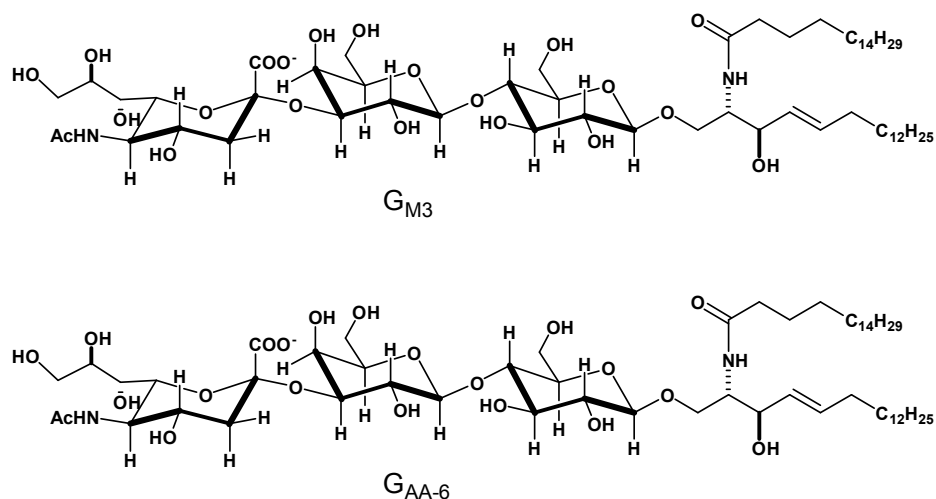


Figura 5.3. I gangliosidi G_{M3} e G_{AA-6}

Inoltre, è estremamente probabile che esistano ancora molti nuovi gangliosidi da echinodermi ancora da identificare. La grande varietà strutturale dei gangliosidi marini rende sicuramente interessante lo studio dell'azione di questi composti sull'angiogenesi, studio che, come spesso è accaduto nel campo dei prodotti naturali, potrebbe mettere in evidenza nuovi meccanismi biologici e in definitiva portare alla creazione di nuovi tipi di farmaci.

5.3.1. Isolamento di gangliosidi da *Paracentrotus lividus*

Lo studio sistematico dei gangliosidi da echinodermi presuppone innanzitutto la disponibilità di una efficiente

metodica per il loro isolamento e purificazione. Il naturale punto di partenza per lo sviluppo di questa metodica è stata la convalidata procedura utilizzata per l'isolamento di glicolipidi neutri descritta nel capitolo 3; questa metodica, come accennato in precedenza, non permette il recupero dei gangliosidi, anche se presenti nell'estratto, probabilmente a causa all'uso di silice non funzionalizzata che può causare un adsorbimento irreversibile dei gangliosidi. Pertanto, a causa della specificità di questo tipo di composti, che presentano nella loro struttura uno o più zuccheri con residui carbossilici carichi negativamente, è stato necessario apportare delle modifiche alla procedura già usata con successo per l'isolamento dei glicosfingolipidi neutri.

Per la messa a punto della procedura d'isolamento alternativa, è stato scelto come organismo di riferimento il *Paracentrotus lividus* (il comune riccio di mare), essenzialmente per la sua facile ed economica disponibilità anche in grande quantità. In letteratura non sono presenti dati relativi alla presenza di gangliosidi in questo organismo, ma un esame preliminare degli estratti ha messo in evidenza la presenza di almeno uno di questi composti.

Secondo la procedura da noi ottimizzata, l'estrazione dell'organismo è stata eseguita come per i glicolipidi neutri, così come la cromatografia a fasi inverse; tuttavia, dopo questa prima purificazione dell'estratto, è stata effettuata una ripartizione tra $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ e CHCl_3 . Si è trovato che i gangliosidi vanno nella fase acquosa, mentre la maggior parte degli altri metaboliti, più apolari (non dimentichiamo che la frazione sottoposta a ripartizione deriva dalle code della cromatografia a fasi inverse su silice RP-18), vanno nella fase organica.

Il passo successivo nell'isolamento dei gangliosidi prevede una cromatografia a scambio ionico, che sfrutta la presenza in questi composti del gruppo carbossilico ionizzato. Come fase stazionaria è utilizzata la resina Sephadex DEAE-A25, che è una resina di tipo polisaccaridica funzionalizzata con gruppi debolmente basici (gruppi dietilamminoetilici). Per separare opportunamente i gangliosidi è stato utilizzato un gradiente di forza ionica, adoperando una miscela ternaria di eluenti costituita da $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, rispettivamente nel rapporto di 30:60:8, poiché i gangliosidi risultano essere poco solubili in acqua

soltanto. In particolare lo schema di eluizione previsto è il seguente:

- 1° eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (100 ml)
- 2° eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.5\text{ M CH}_3\text{COONa in H}_2\text{O}$ (80 ml)
- 3° eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/1.0\text{ M CH}_3\text{COONa in H}_2\text{O}$ (80 ml)
- 4° eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2.0\text{ M CH}_3\text{COONa in H}_2\text{O}$ (80 ml)
- 5° eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/8.0\text{ M CH}_3\text{COONH}_4\text{ in H}_2\text{O}$ (100 ml)

Il campione è stato disciolto in 50 ml del primo eluente e caricato sulla colonna; sono state raccolte frazioni di 5 ml ciascuna, che sono state riunite sulla base di analisi mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su silice. In questo modo è stato possibile ottenere due frazioni contenenti gangliosidi, una eluita con l'eluente 0.5 M in CH_3COONa ed una, trattenuta molto più fortemente, eluita solo con la soluzione 8.0 M in $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

Per poter effettuare la determinazione strutturale è stato poi necessario rimuovere i sali utilizzati nella cromatografia a scambio ionico. La desalificazione è stata effettuata utilizzando

una colonna cromatografica in cui la fase stazionaria è costituita dalla resina Sephadex LH-20 e la fase mobile da MeOH 100%. Tale separazione si basa sul principio dell'esclusione molecolare che permette di separare sostanze di differente dimensione: i gangliosidi, essendo macromolecole, sono eluiti con le prime frazioni, mentre i sali, di dimensioni più piccole del taglio molecolare del gel, diffondono attraverso i micropori della fase stazionaria e vengono quindi eluiti nelle frazioni successive.

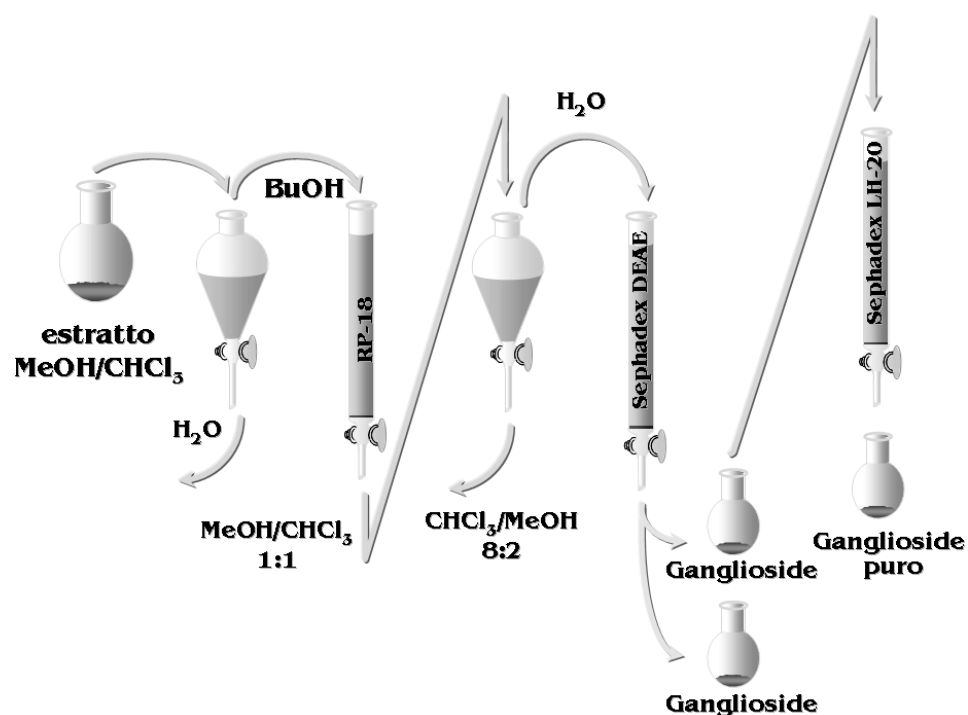
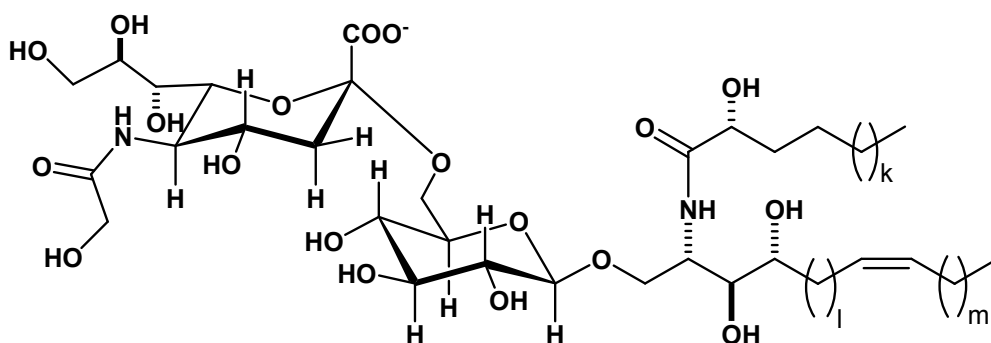
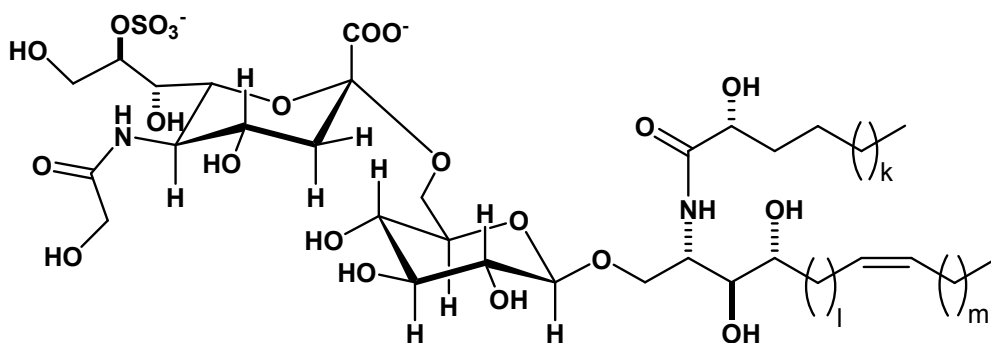


Figura 5.4. La nuova metodica di isolamento di gangliosidi

Grazie alla tecnica d'isolamento appena descritta, si sono ottenuti da *Paracentrotus lividus* due gangliosidi, **1** e **2**, isolati dalle frazioni eluite, durante la cromatografia a scambio ionico, rispettivamente, con l'eluente 0.5 M in CH₃COONa e con l'eluente 8.0 M in CH₃COONH₄. I gangliosidi **1** e **2** apparivano puri per TLC e analisi ¹H NMR, e sono stati utilizzati per i successivi studi diretti alla determinazione strutturale.



1



2

5.3.2. Determinazione strutturale dei gangliosidi 1 e 2

Per la determinazione della struttura del ganglioside **1**, questo è stato in primo luogo sottoposto ad esperimenti di spettrometria di massa. In particolare è stato effettuato lo spettro di massa ESI, che ha evidenziato una serie di picchi dello ione pseudomolecolare $[M + 2 Na]^+$ a m/z 1167, 1181 e 1195 (accompagnati dagli analoghi picchi del tipo $[M + Na + K]^+$ a m/z 1183, 1197 e 1211 e del tipo $[M + 2 K]^+$ a m/z 1199, 1213 e 1227). Questi dati sono in accordo con la formula $C_{57}H_{105}N_2O_{19} + nCH_2$ ($n = 0-2$) per gli ioni del tipo $[M + 2 Na]^+$.

I risultati dello spettro di massa indicano quindi che il composto **1** era in realtà costituito da una miscela di omologhi. Poiché il composto appariva invece omogeneo all'analisi NMR protonica e ^{13}C , è stato possibile concludere che i gangliosidi omologhi erano del tutto identici per quanto riguardava la parte funzionalizzata, ma avevano catene alchiliche di diversa lunghezza. In generale, si è osservato che piccole variazioni nella porzione alchilica dei gangliosidi hanno un'influenza molto piccola sull'attività biologica del ganglioside, per cui non si è ritenuto opportuno procedere nella separazione di **1** in composti

chimicamente puri, ma si è preferito passare direttamente alla determinazione della struttura.

Un'analisi preliminare dello spettro ^1H NMR del composto **1**, registrato in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ (1:1), ha poi evidenziato che si trattava di un ganglioside. Infatti nello spettro era presente un intenso segnale a δ 1.26 dovuto ai metileni delle catene alchiliche, una serie di segnali dei gruppi ossimetilici e ossimetilenici tra δ 4.20 e 3.20 dovuti ai protoni degli zuccheri e quelli della parte polare del ceramide, ed il doppietto di un protone anomero a δ 4.23. Erano inoltre ben visibili i caratteristici segnali dei protoni in posizione 3 dell'acido sialico: un doppio doppietto ($J = 4.5$ e 11.8 Hz) a δ 2.84 (protone equatoriale) ed un tripletto ($J = 11.8$ Hz) a δ 1.63 (protone assiale). Lo spettro ^{13}C NMR confermava la presenza nel ganglioside **1** di due residui zuccherini: un aldoso (CH anomero a δ 104.0) ed un residuo di acido sialico (C anomero non protonato a δ 100.9).

La natura dei residui zuccherini è stata chiarita utilizzando tecniche NMR bidimensionali quali COSY, HSQC e TOCSY. La maggior parte delle informazioni strutturali sono state fornite

dagli esperimenti omonucleari COSY e TOCSY, ma l'analisi di questi spettri è stata resa più facile da un esame preliminare dello spettro eteronucleare HSQC.

Infatti lo spettro HSQC ha permesso innanzitutto di stabilire che nel composto **1** erano presenti 22 protoni su carboni legati ad eteroatomi (N od O), di cui 14 CH e 4 coppie di protoni metilenici. Successivamente, l'analisi dello spettro TOCSY ha permesso di assegnare tutti i protoni dei due zuccheri del ganglioside **1**.

Per quanto riguarda l'aldoso, sono stati utilizzati a questo scopo i picchi di correlazione con il protone anomero, poiché il segnale di questo protone era già stato individuato e non presentava sovrapposizione con altri segnali. Oltre al protone anomero, sono stati identificati 4 CH ed un CH₂, per cui lo zucchero è un aldoseso. Per quanto riguarda l'acido sialico, il punto di partenza per l'assegnazione dei segnali è stato il protone equatoriale sul C-3 dell'acido sialico (H-3''a, δ 2.84). Nello spettro TOCSY erano ben visibili i picchi di correlazione di questo protone con i protoni a δ 1.63, 3.48, 3.72 e 3.63 (in seguito identificati come H-3''b, H-4'', H-5'' e H-6'') ma non con i

protoni sulla catena laterale dell'acido sialico (C-7"—C-9"). Tali protoni sono stati identificati attraverso i loro picchi di correlazione TOCSY con il protone a δ 3.63.

L'assegnazione dei protoni della catena zuccherina è stata completata usando lo spettro COSY. L'esoso è stato identificato come un β -glucopiranoside sulla base dell'analisi delle costanti di accoppiamento tra i protoni dello zucchero. A causa della sovrapposizione di molti segnali, quando necessario le costanti di accoppiamento sono state ricavate utilizzando lo spettro TOCSY: infatti in questo spettro i picchi di correlazione conservano la molteplicità dei segnali dei protoni che li generano. Poiché la risoluzione di uno spettro bidimensionale è minore di quella dello spettro monodimensionale, le costanti più piccole di 2-3 Hz non sono rilevabili in questo modo, ma questo non rappresenta un problema poiché le costanti più utili per la determinazione della stereochimica sono quelle grandi assiale-assiale.

L'esame della molteplicità dei vari segnali ha mostrato che tutte le costanti di accoppiamento tra i protoni del ciclo erano maggiori di 10 Hz (eccetto quella tra i protoni H-1' e H-2', che

comunque era pari a 8.1 Hz). Il fatto che tutte le costanti fossero grandi era una chiara indicazione della natura piranosica dello zucchero, poiché soltanto in un ciclo a sei termini possono essere presenti molte costanti di accoppiamento tra protoni anti tra loro (accoppiamenti assiale-assiale). Inoltre, le costanti di accoppiamento dimostrano che tutti i protoni del ciclo sono assiali, e che quindi lo zucchero è un β -glucopiranoside.

Analogamente, l'analisi delle costanti di accoppiamento (vedi Tabella 5.1) ha mostrato che i protoni in 4", 5" e 6" dell'acido sialico erano assiali, in accordo a quanto è stato sempre osservato nei gangliosidi naturali. La configurazione α del carbonio anomero è stata stabilita sulla base del chemical shift del protone equatoriale sul C-3" (δ 2.84).²⁴ L'analisi delle costanti di accoppiamento non ha permesso di stabilire le configurazioni dei due carboni chirali della catena laterale dell'acido sialico: è stato supposto che esse siano uguali a quelle ritrovate in tutti i gangliosidi noti, cioè 7*R*,8*R*.

Negli normali gangliosidi, il gruppo amminico dell'acido sialico è acilato da un acetile. Nello spettro ^1H NMR del composto **1**, però, il caratteristico singoletto dei protoni metilici

dell'acetile era assente; era invece presente un singoletto a δ 4.04 (2H), relativo quindi ad un metilene legato ad ossigeno. Lo spettro NMR bidimensionale HMBC è servito a chiarire la natura di questo metilene. Il metilene a δ 4.04 mostrava un picco di correlazione nello spettro HMBC con un carbonile a δ 176.8, il quale mostrava nello stesso spettro un picco di correlazione con il protone H-5''' dell'acido sialico. Questi dati dimostravano che nel composto **1** l'acido sialico è acilato da un residuo di acido glicolico invece che da un acetile.

Per quanto riguarda il ceramide, la sua struttura è stata facilmente identificata come quella di una sfingosina triidrossilata (fitosfingosina) acilata da un α -idrossiacido. Questa struttura, ipotizzata sulla base dello spettro COSY, è stata confermata dal confronto dei dati ^1H e ^{13}C NMR del ceramide di **1** con quelli di glicosfingolipidi precedentemente isolati da spugne marine e che hanno un ceramide molto simile.

A differenza dei glicolipidi da spugne, però, le catene alchiliche degli omologhi che compongono il ganglioside **1** sono tutte lineari, come dimostrato dalla regione a campi alti dello spettro NMR protonico, in cui è visibile unicamente un tripletto

a δ 0.87 (6H) relativo ai metili terminali di catene alchiliche non ramificate.

Inoltre, in una delle catene alchiliche del ceramide è presente un doppio legame, che dà conto dell'ultimo sito di insaturazione previsto dalla formula molecolare. La presenza del doppio legame è dimostrata dai segnali a chemical shift coincidente dei due CH olefinici (δ H 5.31, δ C 130.2) e da quelli dei relativi due metileni allilici (δ H 2.01, δ C 27.5) negli spettri ^1H e ^{13}C NMR. Questi dati indicano che il doppio legame è lontano dalla parte funzionalizzata della molecola, ma non permettono di stabilire la sua posizione esatta.

Infine, il legame tra il glucopiranoside e l'ossigeno in 1 della sfingosina è dimostrato dal picco di correlazione tra il protone H-1a (δ 4.06) ed il carbonio anomero a δ 104.0 nello spettro HMBC; la glicosilazione in 6 del glucosio è dimostrata dal picco di correlazione tra uno dei protoni sul C-6' (δ 4.02) con il carbonio anomero dell'acido sialico (C-1", δ 100.9).

Tabella 5.1. Dati NMR del ganglioside **1** (CDCl₃/CD₃OD)

Pos.	δ_H (mult, <i>J</i> (Hz))	δ_C (mult)
1 a b	4.06 ^a 3.75 ^a	69.5 (CH ₂)
2	4.18 (m)	50.8 (CH)
3	3.65 ^a	74.4 (CH)
4	3.52 (m)	72.4 (CH)
5	1.59 (m)	28.4 (CH ₂)
1'	4.23 (d, 7.8)	103.8 (CH)
2'	3.21 (t, 8.6)	74.1 (CH)
3'	3.37 (t, 8.6)	76.6 (CH)
4'	3.48 (t, 8.6)	70.4 (CH)
5'	3.31 ^a	75.5 (CH)
6' a b	4.02 ^a 3.74 ^a	63.2 (CH ₂)
1''	-	173.5 (C=O)
2''	-	100.9 (C)
3'' a b	2.84(dd, 12.5, 4.7) 1.63 (t, 11.8)	41.8 (CH ₂)
4''	3.79 (t, 12.4)	68.5 (CH)
5''	3.73 (t, 9.4)	53.1 (CH)
6''	3.64 (t, 8.6)	73.3 (CH)
7''	3.48 ^a	69.5 (CH)
8''	3.85 (m)	71.9 (CH)
9'' a b	3.82 ^a 3.62 ^a	64.0 (CH ₂)
G	4.04 (s)	62.0 (CH ₂)
1'''	-	176.8 (C=O)
2'''	4.03 ^a	72.3 (CH)

^aSovrapposto ad altri segnali.

Per quanto riguarda il composto **2**, anche questo è stato innanzitutto sottoposto ad esperimenti di spettrometria di massa. Lo spettro di massa ESI evidenziava una serie di picchi dello ione pseudomolecolare $[M + 3 Na]^+$ a m/z 1254, 1268 e 1282 indicando che il ganglioside **2** era costituito da una miscela di omologhi che differivano tra loro di un'unità metilenica, e che, come nel caso del ganglioside **1**, non sono stati ulteriormente separati. In particolare, lo spettro di massa ad alta risoluzione ESI presentava un intenso picco a m/z 1255,6696, in accordo con la formula molecolare $C_{57}H_{106}N_2O_{21}S$.

La struttura del ganglioside **2** è stata determinata sulla base dei dati ottenuti dall'analisi spettroscopica condotta su tale composto in maniera del tutto analoga a quanto descritto precedentemente per la determinazione strutturale del composto **1** (vedi Tabella 5.2). La struttura di **2** risultava molto simile a quella del ganglioside **1**: anche in questo caso il primo zucchero era un β -glucopiranoside, mentre l'acido sialico, legato alla posizione 6 del β -glucopiranoside, era caratterizzato dalla presenza di un residuo di acido glicolico, al posto del più comune acetile, legato al gruppo amminico. Tuttavia, nel

composto **2** era evidente la presenza di un gruppo solfato, sia per formula molecolare ricavata dallo spettro di massa ESI ad alta risoluzione, sia per le caratteristiche di polarità del ganglioside **2**, che è stato isolato dalla frazione eluita, durante la cromatografia a scambio ionico, solo quando è stata utilizzata la soluzione 8.0 M in $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, e quindi presenta un carattere fortemente anionico. I chemical shift a campi relativamente bassi del protone H-8" dell'acido sialico (δ 4.46) e del corrispondente carbonio (δ 79.7) dimostravano che l'ossidrile solfatato era quello in posizione 8".

Quindi il ganglioside **2** differisce dal ganglioside **1** solo per la solfatazione dell'ossidrile in 8 dell'acido sialico. Questa variazione strutturale fa cambiare notevolmente le caratteristiche di polarità dal ganglioside, che diventa fortemente anionico a tutti i pH.

Tabella 5.2. Dati NMR del ganglioside **2**(CDCl₃/CD₃OD)

Pos.	δ_H (mult, <i>J</i> (Hz))	δ_C (mult)
1 a b	4.14 ^a 3.74 ^a	70.4 (CH ₂)
2	4.22 (m)	50.8 (CH)
3	3.68 ^a	74.5 (CH)
4	3.60 (m)	72.7 (CH)
5	1.59 (m)	28.4 (CH ₂)
1'	4.31 (d, 7.9)	104.4 (CH)
2'	3.30 (t, 8.1)	73.9 (CH)
3'	3.42 ^a	76.4 (CH)
4'	3.51 ^a	70.1 (CH)
5'	3.41 ^a	75.3 (CH)
6' a b	3.93 ^a 3.93 ^a	62.2 (CH ₂)
1''	-	173.5 (C)
2''	-	100.9 (C)
3'' a b	2.55(dd, 12.2, 4.7) 1.72 (t, 12.2)	39.1 (CH ₂)
4''	4.07 ^a	68.2 (CH)
5''	3.90 ^a	52.9 (CH)
6''	3.91 ^a	73.2 (CH)
7''	3.73 (br.d)	67.9 (CH)
8''	4.46 (m)	79.7 (CH)
9'' a b	4.09 ^a 3.88 ^a	61.2 (CH ₂)
G	4.06 (s)	62.1(CH ₂)
1'''	-	176.8 (C)
2'''	4.03 ^a	72.6 (CH)

^aSovrapposto ad altri segnali.

In base ai dati appena riportati, è possibile stabilire che i gangliosidi **1** e **2** hanno una struttura notevolmente differente da quella del ganglioside a due zuccheri presente nei mammiferi, il G_{M4} (Fig. 5.5), in cui il primo zucchero è un galattosio invece che un glucosio, ed in cui si ha in legame glicosidico (1→3) invece che (1→6) tra i due zuccheri.

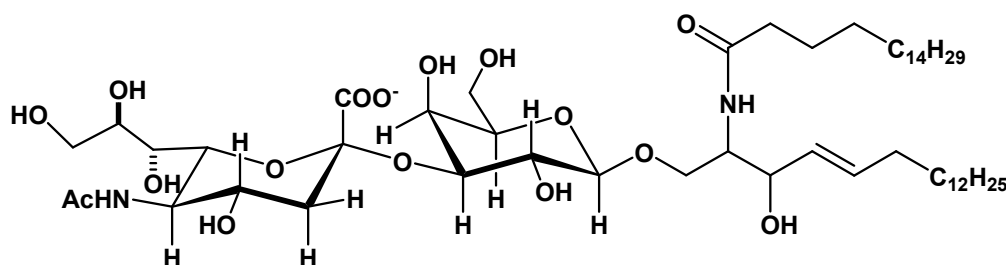


Figura 5.5. Il ganglioside G_{M4}

Sebbene le principali caratteristiche dei gangliosidi **1** e **2** siano state definite, restavano ancora da determinare alcuni dettagli strutturali, ossia la lunghezza delle catene alchiliche della sfingosina e dell'acido grasso, la stereochimica dei carboni chirali presenti nel ceramide, la stereochimica assoluta degli zuccheri e la posizione del doppio legame all'interno del ceramide. Tuttavia, siccome composti del tipo di **1** e **2** sono già

stati isolati da altre specie di ricci, si è preferito passare direttamente alla valutazione dell'attività biologica, dal momento che nulla era riportato in letteratura sull'attività sull'angiogenesi di questi composti.

5.3.3. Effetto dei gangliosidi 1 e 2 sulla proliferazione di cellule endoteliali umane

L'attività antiangiogenica dei gangliosidi **1** e **2** è stata studiata in collaborazione con l'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (IBB) del CNR di Napoli.

Un modello cellulare idoneo allo screening di gangliosidi, che possono agire come antagonisti del fattore di crescita vascolare endoteliale (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), è stato individuato nelle cellule endoteliali umane derivate da cordone ombelicale (Human umbilical Vein Endothelial Cells, HuVEC) cresciute in un mezzo di crescita endoteliale (Endothelial Growth Medium, EGM) costituito da mezzo basale di Eagle (Eagle's Basal Medium, EBM) supplementato con FCS (fetal calf serum) 2%, VEGF 0.5ng/ml, eparina 22.5µg/ml, EGF (Epidermal Growth Factor) 0.1ng/ml, bFGF (basal Fibroblast Growth Factor) 1ng/ml, idrocortisone

1µg/ml, anfotericina B 50ng/ml, gentamicina 50µg/ml. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 48 ore ed in tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule tra il 3° ed il 7° passaggio.

La proliferazione cellulare è stata valutata secondo un metodo²⁵ che correla linearmente le densità ottiche al numero di cellule in coltura. In breve, alla fine del tempo di incubazione le cellule sono state fissate e colorate per 20 minuti con 0,1% crystal violet a pH 6,0. Dopo lavaggi con H₂O per allontanare l'eccesso di colorante e solubilizzazione dei monolayer cellulari con 10% acido acetico, le densità ottiche sono state lette con un plate reader a 595nm.

Al fine di determinare la concentrazione ottimale di VEGF₁₆₅ per indurre una risposta proliferativa, le cellule HuVEC, tenute in EBM con bassa concentrazione di siero (1%) senza altri fattori di crescita per 24 ore, sono state stimulate con diverse concentrazioni di VEGF₁₆₅ (da 0 a 50ng/ml) per 72 ore (Fig.5.6).

Le HuVEC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 1×10^4 /pozzetto in EGM per 24 ore. Dopo la rimozione del mezzo le cellule sono state tenute per 24 ore in EBM con 1%

FBS e, successivamente, sono state incubate in assenza o in presenza di VEGF₁₆₅ a varie concentrazioni per 72 ore.

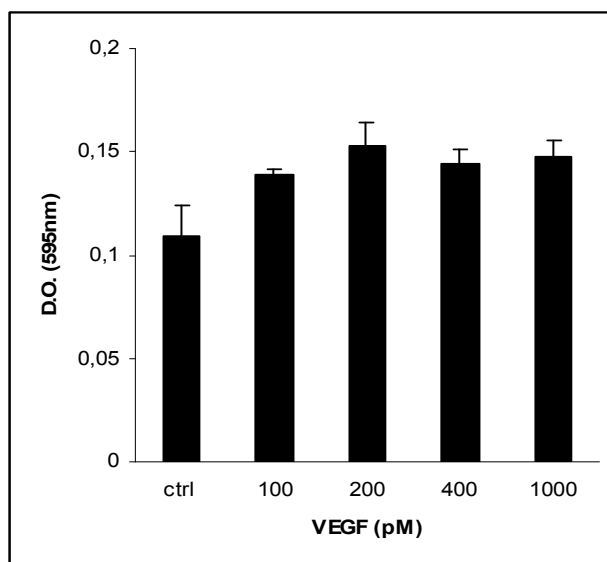


Figura 5.6. Induzione della proliferazione di cellule HuVEC con diverse concentrazioni di VEGF (le barre di errore indicano la deviazione standard su due esperimenti in duplicato).

Il massimo incremento della proliferazione, circa il 40% rispetto al controllo, è stato indotto con 10ng/ml di VEGF₁₆₅, e pertanto tale concentrazione è stata utilizzata in tutti gli esperimenti successivi. Dopo la caratterizzazione del sistema cellulare in relazione alla risposta al mitogeno, si è passati ad analizzare la capacità antiproliferativa dei gangliosidi **1** e **2**; per saggiare l'effetto dei gangliosidi sulla proliferazione cellulare è stato utilizzato il seguente schema sperimentale:^{26,27}

1. Semina in EGM overnight;
2. Trattamento con il ganglioside per 1 ora in EBM con 1% FCS;
3. Incubazione con e senza VEGF₁₆₅ 10ng/ml in EBM con 1% di FCS per 72 ore.

La concentrazione di 10 μ M del ganglioside **2** riduce la proliferazione delle HuVEC di circa il 30% rispetto al controllo, mentre concentrazioni più basse non risultano avere effetti statisticamente significativi (Fig. 5.7).

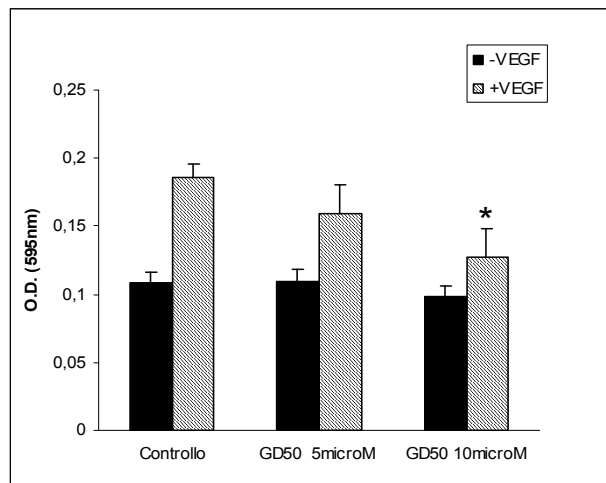


Figura 5.7. Effetto del ganglioside **2** sulla proliferazione di cellule HuVEC indotta da di VEGF [le barre di errore indicano l'errore standard di tre esperimenti in duplicato (* $p < 0.05$)].

Nelle stesse condizioni sperimentali, il ganglioside **1** non ha effetto sull'induzione dell'attività proliferativa provocata dal VEGF (Fig. 5.8).

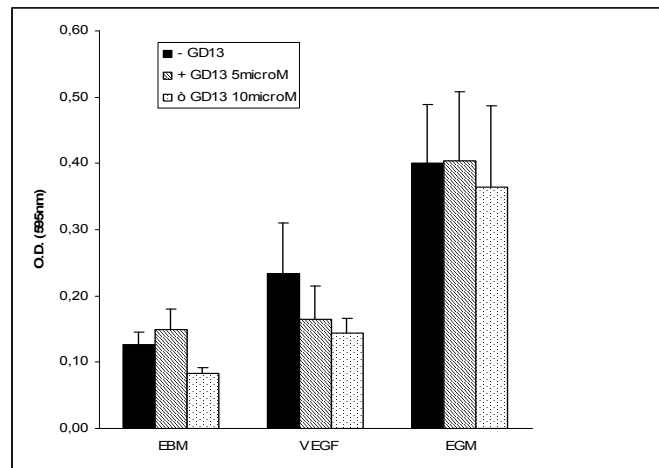
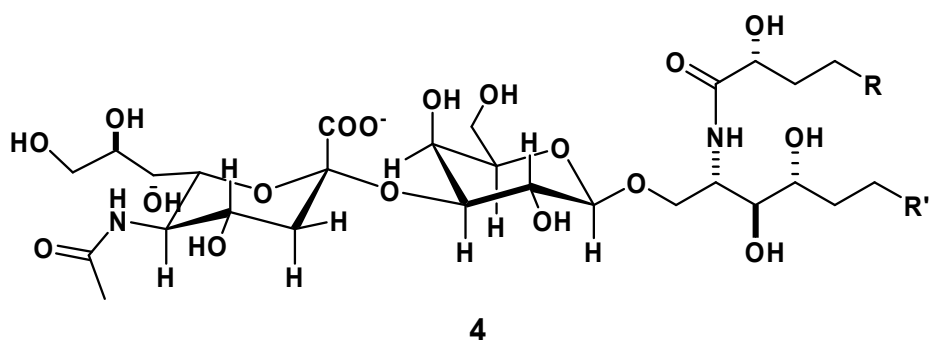
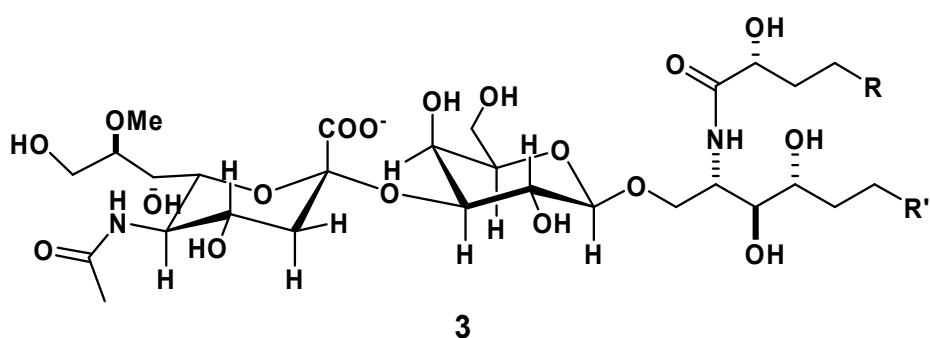


Figura 5.8. Effetto del ganglioside **1** sulla proliferazione di cellule HuVEC indotta da VEGF (Le barre di errore indicano l'errore standard di tre esperimenti in duplicato).

Pertanto, dai risultati dei saggi di proliferazione cellulare condotti sia su **1** che su **2**, è risultato che solo il ganglioside **2** ha mostrato attività antiangiogenica, evidenziando quindi l'importanza della solfatazione al fine dell'attività antiproliferativa.

5.4. Gangliosidi dalla stella *Oreaster reticulatus*

Dalla stella marina *Oreaster reticulatus*, raccolta nel Mar dei Caraibi, sono stati isolati due nuovi gangliosidi, **3** e **4**. In questo caso la separazione tra i due composti ha richiesto la loro peracetilazione, per cui i composti sono stati ottenuti in forma molto pura, ma sotto forma dei loro peracetil derivati. I gangliosidi **3** e **4** sono composti nuovi, mai precedentemente isolati da fonti naturali, e rappresentano il primo esempio di gangliosidi da echinodermi la cui struttura è molto simile a quella del ganglioside G_{M4} normalmente presente negli animali superiori.



5.4.1. Isolamento dei peracetil derivati dei gangliosidi 3 e 4

Alcuni esemplari della stella marina *Oreaster reticulatus*, raccolti a Grand Bahamas Island (Sweeting Cay) nel Giugno 2003, sono stati congelati subito dopo la raccolta e tenuti in freezer fino al momento dell'analisi. L'organismo è stato sottoposto alla procedura descritta nel dettaglio nel capitolo precedente per l'ottenimento di frazioni contenenti gangliosidi, che prevede estrazione, cromatografia a fasi inverse, ripartizione tra H₂O/MeOH e CHCl₃, cromatografia a scambio ionico della fase acquosa ed infine desalificazione delle frazioni ottenute mediante cromatografia ad esclusione molecolare. In questo modo sono state ottenute due frazioni contenenti gangliosidi, entrambe provenienti dalla frazione eluita con l'eluente 0.5 M in CH₃COONa. Tuttavia, è stato piuttosto difficile ottenere gangliosidi in forma pura a partire dalle miscele così ottenute: infatti, non è stato possibile utilizzare l'HPLC a fasi inverse, in quanto, come detto in precedenza, i gangliosidi naturali sono costituiti da miscele di omologhi che differiscono solo per la lunghezza delle catene, e pertanto questa tecnica avrebbe portato alla separazione dei vari omologhi piuttosto che alla separazione

dei gangliosidi con differente catena zuccherina; d'altra parte, non si è potuta usare nemmeno la cromatografia a fasi dirette, in quanto i gangliosidi vengono adsorbiti irreversibilmente dalla silice non funzionalizzata.

Questo problema è stato risolto effettuando una preventiva peracetilazione delle frazioni da purificare con Ac_2O in piridina. In questo modo tutti i gruppi ossidrilici dei gangliosidi sono stati convertiti in gruppi acetossi, rendendo quindi le molecole non più anfifiliche ma essenzialmente apolari. Una volta peracetilate, è stato possibile purificare le miscele per HPLC a fase diretta utilizzando come eluente una miscela di *n*-esano/ AcOEt (4:6); da tale separazione si sono ottenuti i gangliosidi peracetilati **5** e **8** (oltre ad altri due derivati peracetilati **7** e **9**, come verrà spiegato in seguito). Tali composti, da una preliminare analisi NMR e per confronto con dati di riferimento, risultavano essere puri e mai riportati in letteratura.

5.4.2. Determinazione strutturale del ganglioside 3

Per la determinazione strutturale del ganglioside **3**, il ganglioside peracetilato **5** è stato in primo luogo sottoposto ad

esperimenti di spettrometria di massa. In particolare è stato effettuato lo spettro di massa ESI, che ha evidenziato una serie di picchi dello ione pseudomolecolare $[M+Na]^+$ che differivano tra loro di una unità metilenica (14 amu) a m/z 1436, 1450, 1464 e 1478, indicando che il composto **5** era costituito da una miscela di omologhi, che non sono stati ulteriormente separati. Inoltre, le catene alchiliche della miscela differivano non solo nella lunghezza, ma anche nelle ramificazioni, in quanto lo spettro NMR protonico del composto **5** registrato in $CDCl_3$ mostrava nella regione metilica un tripletto a δ 0.88 (gruppo etilico terminale) e un doppietto a δ 0.85 (gruppo isopropilico terminale), le cui integrazioni non erano in rapporto intero con gli altri segnali nello spettro.

Un'analisi preliminare dello spettro 1H NMR del composto **5** registrato in $CDCl_3$ ha poi confermato che si trattava di un ganglioside, come mostrato:

1. dai caratteristici segnali dei protoni in posizione 3 dell'acido sialico: un doppio doppietto ($J = 13.7$ e 5.5 Hz) a δ 2.47 (protone equatoriale) ed un tripletto ($J = 13.7$ Hz) a δ 1.89 (protone assiale);

2. da due caratteristici doppietti ammidici a δ 6.57 e δ 5.15. Il fatto che i doppietti ammidici fossero due era dovuto alla presenza della funzione ammidica dell'acido sialico, oltre alla funzione ammidica del ceramide;
3. da un intenso segnale a δ 1.25 dovuto ai metileni delle catene alchiliche;
4. da nove singoletti tra δ 2.24 e δ 1.88, corrispondenti ai metili acetilici;
5. da segnali relativi a protoni carbinolici tra δ 5.44 e δ 3.40, dovuti ai protoni degli zuccheri e a quelli della parte polare del ceramide;
6. da un singoletto integrante per 3 protoni a δ 3.49, che indicava la presenza di un metossile.

Come avviene solitamente per le molecole glicolipidiche, molte risonanze risultavano sovrapposte. Per risolvere questo problema, gli spettri NMR sono stati registrati utilizzando due differenti solventi: CDCl_3 e C_6D_6 .

Lo spettro ^{13}C NMR registrato in CDCl_3 confermava la presenza nel composto **5** di due residui zuccherini: un aldoso

(CH anomerico a δ 99.6) ed un residuo di acido sialico (C anomerico non protonato a δ 100.9).

La natura dei residui zuccherini è stata poi chiarita utilizzando le tecniche NMR bidimensionali COSY ed HSQC. La maggior parte delle informazioni strutturali sono state fornite dall'esperimento omonucleare COSY, ma l'analisi di questo spettro è stata resa più facile da un esame preliminare dello spettro eteronucleare HSQC.

Infatti i dati ottenuti dall'esperimento NMR HSQC hanno permesso innanzitutto di attribuire il segnale del protone anomerico a δ 3.84 (C_6D_6 , H-1'), valore che è stato quindi utilizzato come punto di partenza per identificare, in sequenza, tutti i protoni dell'aldoso: essendo stati identificati 4 CH ed un CH_2 , si è potuto stabilire che lo zucchero in questione era un aldoesoso.

Per quanto riguarda l'acido sialico, i valori dei chemical shift protonici sono stati analogamente determinati tramite lo spettro COSY, partendo per l'assegnazione dei segnali dal protone equatoriale sul C-3 (C_6D_6 , H-3''a, δ 2.59). Inoltre, i protoni del metossile a δ 3.96 mostravano un intenso picco di correlazione

nello spettro HMBC con il carbonio C-8", dimostrando che l'OH in 8 dell'acido sialico era metilato e non acetilato.

Per quanto riguarda la stereochimica relativa dell'esoso, questo è stato identificato come un β -galattopiranoside sulla base dell'analisi delle costanti di accoppiamento tra i protoni dello zucchero:

1. H-2' e H-3' sono entrambi assiali, come indicato dalla loro grande costante di accoppiamento assiale-assiale ($J = 10.8$ Hz).
2. H-4' è equatoriale, come dimostrato dalla sua piccola costante di accoppiamento con il protone assiale H-3' ($J = 2.6$ Hz; la costante con H-5' è così piccola da provocare solo un allargamento del segnale).
3. la stereochimica β del legame glicosidico è stata evidenziata dalla costante di accoppiamento grande di H-1' ($J = 7.7$ Hz) con il protone assiale H-2'. Il protone H-1' è quindi assiale.

Per quanto riguarda l'orientazione di H-5', questa non era determinabile dalla costante di accoppiamento con H-4', poiché quest'ultimo protone è equatoriale, e quindi avremmo osservato una costante di accoppiamento piccola sia con un H-5' assiale

che con un H-5' equatoriale. Per assegnare l'orientazione di tale protone abbiamo dovuto usare un esperimento NMR ROESY.

Lo spettro ROESY del composto **5** mostrava un intenso picco di correlazione tra i protoni H-5' e H-3', che indica una relazione 1-3 diassiale tra i due protoni, e quindi l'orientazione assiale di H-5'. Sulla base dei dati esposti, il primo zucchero è quindi un β -galattopiranoside.

Analogamente, l'analisi delle costanti di accoppiamento (vedi Tabella 5.3) ha mostrato che i protoni in 4'', 5'' e 6'' dell'acido sialico erano assiali, in accordo a quanto è stato sempre osservato nei gangliosidi naturali. La configurazione α del carbonio anomero è stata stabilita sulla base del chemical shift del protone equatoriale sul C-3'' (δ 2.59). L'analisi delle costanti di accoppiamento non ha permesso di stabilire le configurazioni dei due carboni chirali della catena laterale dell'acido sialico: è stato supposto che esse siano uguali a quelle ritrovate in tutti i gangliosidi noti, cioè 7*R*,8*R*.

Infine, per quando riguarda il ceramide, la sua struttura è stata facilmente identificata come quella di una sfingosina satura triidrossilata (fitosfingosina) acilata da un α -idrossiacido.

Questa struttura, ipotizzata sulla base dello spettro COSY, è stata confermata dal confronto dei dati ^1H e ^{13}C NMR del ceramide del composto **5** con quelli di peracetil derivati di glicosfingolipidi (per esempio il GSL riportato in figura 5.9) precedentemente isolati da spugne marine e che hanno un ceramide molto simile.

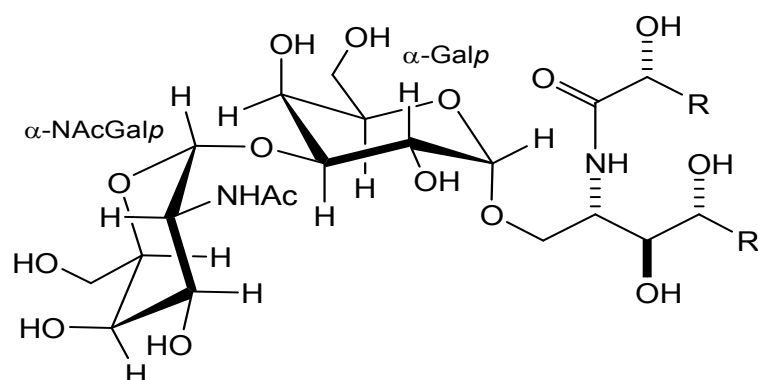


Figura 5.9. Un diglicosilceramide con sfingosina triidrossilata ed α -idrossiacido

Il legame tra il galattopiranoside e l'ossigeno in 1 della sfingosina è stato dimostrato in base alla presenza del picco di correlazione tra il protone anomeroico H-1' (δ 3.84) ed il carbonio C-1 a δ 67.5 nello spettro HMBC, mentre la glicosilazione in 3 del galattosio è dimostrata dal valore di chemical shift del protone H3' (δ 3.08): tale valore indicava infatti che l'OH in posizione 3' non risultava acetilato, in quanto

i segnali dei protoni relativi a ossimetini acetilati risuonano a campi notevolmente più bassi (δ 4.7-5.7).

Tuttavia un ganglioside peracetilato contenente un esoso, un acido sialico con un *O*-metile ed un ceramide composto da una fitosfingosina e un α -idrossiacido dovrebbe avere 10 acetili, mentre nello spettro NMR protonico erano presenti solo 9 singoletti di metili acetitici. Inoltre la formula molecolare del composto **5**, ricavata dall'analisi dello spettro di massa ESI ad alta risoluzione, indicava la presenza di un'insaturazione in più e di un ossigeno in meno di quanto atteso sulla base dei dati ricavati dall'analisi degli spettri NMR.

La mancanza dell'acetile può essere spiegata ipotizzando la formazione di un anello lattonico tra il carbossile dell'acido sialico ed uno degli ossidrili dell'esoso, avvenuta presumibilmente durante la reazione di peracetilazione; purtroppo, però, l'effettiva presenza di un anello lattonico e l'eventuale posizione di chiusura del lattone non potevano essere stabilite tramite l'analisi dei chemical shift. Infatti l'ossidrile impegnato nell'anello lattonico è acilato così come quelli

acetilati, per cui i relativi protoni metinici hanno chemical shift simili.

Allo scopo di verificare tale supposizione, è stata effettuata sul composto **5** una blanda metanolisi basica con metanolo e piridina, che ha portato alla formazione del derivato **6**. Lo spettro di massa ESI del composto **6** mostrava la stessa distribuzione dei picchi dello ione pseudomolecolare $[M+Na]^+$ distanziati di 14 uma l'uno dall'altro già osservata per il composto **5**. Tuttavia la massa di ogni ione (1468, 1482, 1496 e 1510) risultava maggiore di 32 uma (corrispondenti all'aggiunta di una molecola di MeOH) rispetto ai rispettivi ioni di **5**. Questo suggeriva che nel derivato **6** l'anello lattonico si fosse aperto, ed il residuo di acido sialico fosse presente sottoforma di estere metilico. La definitiva conferma della presenza, e quindi della conseguente apertura in seguito a metanolisi, dell'anello lattonico è stata fornita dall'analisi tramite spettroscopia NMR condotta sul composto **6**. I segnali negli spettri 1H e ^{13}C NMR del derivato **6**, attribuiti come in precedenza in seguito all'analisi degli spettri NMR bidimensionali HSQC e COSY (vedi tabella 5.4), risultavano molto simili a quelli del composto **5**, fatta eccezione per due

differenze fondamentali: innanzitutto la presenza, nello spettro ^1H NMR di **6**, di un segnale a δ 3.63, integrante per tre protoni, attribuibile al CH_3 di un gruppo metossilico, che confermava la presenza di un estere metilico. In secondo luogo, il protone H_2' risuonava ad un chemical shift notevolmente più basso rispetto allo stesso protone in **5** (δ 4.20 contro δ 4.88), indicando che il relativo ossidrile non era più impegnato in un legame estereo; da questo dato risultava evidente che la posizione di chiusura dell'anello lattonico era proprio la posizione 2 del β -galattopiranoside. In base ai dati appena riportati, le strutture dei composti **5** e **6** risultano le seguenti:

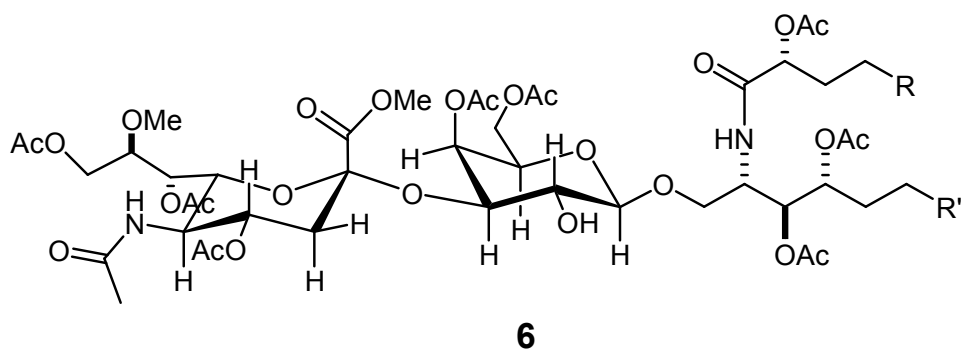
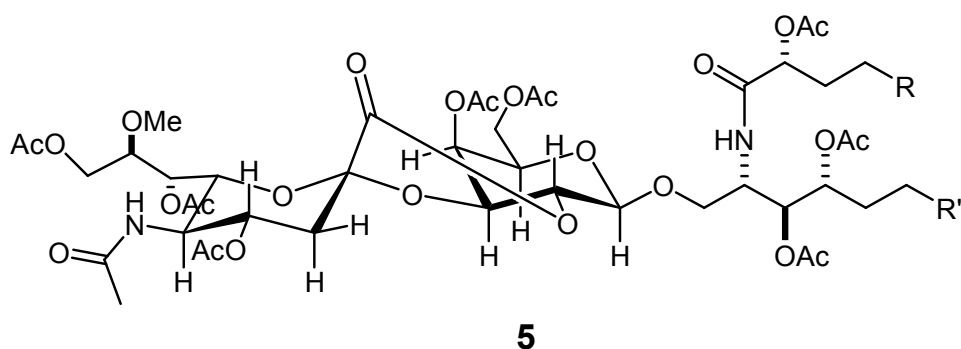


Tabella 5.3. Dati NMR del composto **5**

Pos.	CDCl ₃		C ₆ D ₆	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.02 (dd, 10.0, 2.7)	67.9 (CH ₂)	3.90 (m)	67.6 (CH ₂)
1b	3.48 (HSQC)		3.18 (d, 9.4)	
2	4.31(HSQC)	77.8 (CH)	4.57 (t, 10.2)	77.5 (CH)
2-NH	6.57 (d, 9.3)	----	6.77 (d, 9.6)	----
3	5.06 (dd, 10.2, 2.0))	71.3 (CH)	5.41 (d, 10.2)	71.0 (CH)
4	overlapped	73.6 (CH)	5.19 (d, 10.9)	73.3 (CH)
1'	4.45 (d, 7.8)	99.6 (CH)	3.84 (d, 7.7)	99.4 (CH)
2'	overlapped	73.6 (CH)	4.88 (dd, 10.8, 7.7)	73.4 (CH)
3'	3.99 (dd, 11.2, 2.9)	74.3 (CH)	3.08 (dd, 10.8, 2.6)	73.6 (CH)
4'	5.44 (s)	66.6 (CH)	5.28 (d, 2.6)	66.1 (CH)
5'	3.91 (t, 6.6)	71.5 (CH)	3.27 (t, 6.6)	71.1 (CH)
6'a	4.13 (HSQC)	61.5 (CH ₂)	4.11 (dd, 11.1, 6.8)	61.0 (CH ₂)
6'b			4.00 (dd, 11.8, 6.6)	
1''	----	----	----	164.0 (C)
2''	----	----	----	97.0 (C)
3''a	2.47 (dd, 13.7, 5.5)	38.1 (CH ₂)	2.59 (dd, 13.5, 5.3)	38.2 (CH ₂)
3''b	1.89 (t, 13.7)		1.85 (m)	
4''	5.37 (ddd, 10.7, 5.5, 5.1)	70.1 (CH)	5.50 (dd, 12.8, 6.6)	69.7 (CH)
5''	4.14 (HSQC)	49.6 (CH)	4.40 (m)	48.7 (CH)
5''-NH	5.15 (d, 10.2)	----	overlapped	----
6''	3.86 (d, 10.8)	72.7 (CH)	3.98 (HSQC)	72.6 (CH)
7''	5.20 (d, 9.5)	67.6 (CH)	5.32 (d, 9.6)	67.2 (CH)
8''	3.59 (d, 9.5)	76.0 (CH)	3.98 (HSQC)	72.6 (CH)
8''-OCH₃	3.49 (s)	57.5 (CH ₃)	3.96 (s)	57.3 (CH ₃)
9''a	4.34 (dd, 12.9, 3.2)	60.0 (CH ₂)	4.78 (dd, 12.8, 3.0)	60.0 (CH ₂)
9''b	4.04 (dd, 12.9, 2.0)		4.28 (m)	
2'''	5.16 (dd, 7.6, 4.9)	74.5 (CH)	5.49 (HSQC)	74.7 (CH)
Ac's	2.24(s), 2.20(s), 2.07(s), 2.07(s), 2.06(s), 2.04(s), 2.02(s), 2.01(s), 1.88(s)	23.7-20.8 (CH ₃)	2.37 (s), 2.04 (s), 1.96 (s), 1.87(s), 1.80(s), 1.77(s), 1.74 (s), 1.62(s), 1.55(s)	21.0–20.0 (CH ₃)

Tabella 5.4. Dati NMR del composto **6**

Pos.	C₆D₆	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.02 (HSQC)	67.6 (CH ₂)
1b	3.72 (HSQC)	
2	4.65 (m)	48.4 (CH)
2-NH	7.30 (d, 8.4)	----
3	5.57 (dd, 8.3, 2.8)	72.6 (CH)
4	5.31 (d, 10.2)	73.4 (CH)
1'	4.32 (HSQC)	103.8 (CH)
2'	3.86 (t, 9.9)	70.0 (CH)
3'	4.36 (HSQC)	74.3 (CH)
4'	5.47 (br. d, 3.2)	69.2 (CH)
5'	3.74 (HSQC)	71.3 (CH)
6'a	4.34 (HSQC)	61.8 (CH ₂)
6'b	4.19 (dd, 11.1, 6.4)	
1''-COOCH₃	3.63 (s)	58.2 (CH ₃)
3''a	2.78 (dd, 13.2, 5.1)	37.0 (CH ₂)
3''b	2.16 (m)	
4''	5.18 (ddd, 11.3, 5.0, 5.0)	69.1 (CH)
5''	4.28 (t, 10.6)	49.2 (CH)
5''-NH	overlapped	----
6''	4.01 (HSQC)	72.8 (CH)
7''	5.24 (d, 9.4)	68.3 (CH)
8''	4.14 (m)	76.4 (CH)
8''-OCH₃	3.51 (s)	52.2 (CH ₃)
9''a	4.53 (dd, 12.4, 3.6)	62.4 (CH ₂)
9''b	4.40 (dd, 12.4, 3.6)	
2'''	5.39 (t, 6.3)	74.5 (CH)
Ac's	2.10 (s), 2.08 (s), 1.88 (s), 1.80(s), 1.77(s), 1.76(s), 1.71 (s), 1.60 (s), 1.53(s)	20.6–20.0 (CH ₃)

Inoltre, il cromatogramma della separazione per HPLC che ha permesso di isolare i gangliosidi peracetilati **5** e **8** conteneva un ulteriore picco, eluito con un tempo di ritenzione inferiore rispetto a quello del composto **5**, che corrispondeva ad un altro composto (**7**); il composto **7**, da un'analisi preliminare dello spettro ^1H NMR, risultava differente dal composto **5** ed era stato inizialmente ritenuto il peracetil derivato di un altro ganglioside.

Lo spettro di massa ESI di **7** evidenziava una serie di picchi dello ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{Na}]^+$ che differivano tra loro di una unità metilenica (14 amu) a m/z 1394, 1408, 1422 e 1436, indicando che anche questo composto era costituito da una miscela di omologhi, che non sono stati ulteriormente separati; la massa di ogni ione risultava minore di 42 uma (corrispondenti all'assenza di un acetile) rispetto ai rispettivi ioni di **5**. Inoltre, i chemical shift di quasi tutti i protoni degli zuccheri del composto **7** risultavano molto simili a quelli del composto **5** (vedi tabella 5.5), fatta eccezione per il protone H-7", che nel composto **7** aveva un chemical shift molto più basso (δ 3.70 contro δ 5.32), indicando che il relativo ossidrile non era acetilato. Inoltre, la presenza del protone OH-7" (un doppietto a

δ 4.95 accoppiato ad H-7'') nello spettro NMR protonico dimostrava che l'ossidrile in 7'' è affettivamente libero e non impegnato in un legame etereo.

L'insieme di questi dati ci ha permesso di affermare che il composto **7** è del tutto analogo al composto **5**, ma manca dell'ossidrile in posizione 7 dell'acido sialico. Il motivo per cui questo acetile non è acetilato nella reazione di peracetilazione non è ancora chiaro, ma è probabilmente collegato a fattori sterici. In ogni caso, è sorprendente il comportamento cromatografico del composto **7**, che ha un ossidrile libero anziché acetilato rispetto al composto **5**, e dovrebbe quindi essere un composto più polare di **5**, ma viene eluito con un tempo di ritenzione minore sulle colonne di silice.

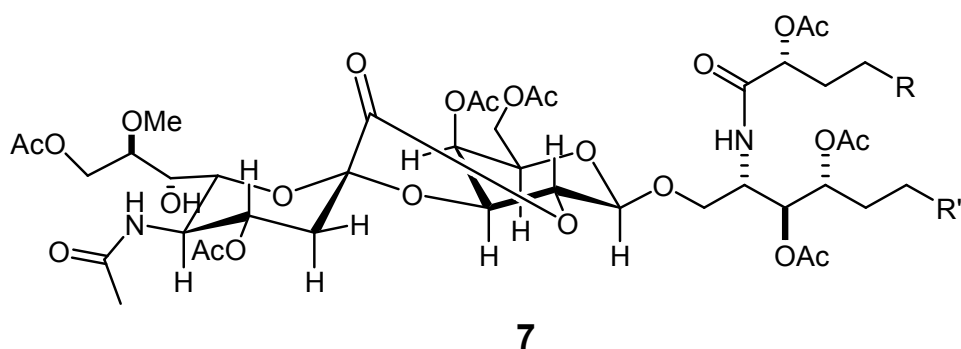


Tabella 5.5. Dati NMR del composto **7**

Pos.	CDCl ₃		C ₆ D ₆	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.01 (dd, 9.9, 1.9)	67.7 (CH)	3.92 (d, 8.1)	67.56 (CH ₂)
1b	3.49 (HSQC)		3.22 (d, 9.6)	
2	4.29 (t, 2.3)	76.3 (CH)	4.17 (t, 2.4)	77.3 (CH)
2-NH	6.61 (d, 9.3)	----	6.80 (d, 9.5)	----
3	5.04 (d, 9.8)	71.2 (CH)	5.39 (d, 10.4)	71.1 (CH)
4	4.78 (m)	73.1 (CH)	5.23 (d, 12.7)	73.1 (CH)
1'	4.43 (d, 7.8)	99.8 (CH)	3.88 (d, 7.7)	99.6 (CH)
2'	4.77 (m)	73.1 (CH)	4.97 (dd, 10.7, 7.7)	73.3 (CH)
3'	3.97 (dd, 10.6, 2.5)	74.0 (CH)	3.16 (dd, 10.7, 2.7)	73.7 (CH)
4'	5.43 (s)	66.1 (CH)	5.32 (s)	65.9 (CH)
5'	3.90 (HSQC)	71.4 (CH)	3.31 (t, 6.6)	71.1 (CH)
6'a	4.13 (HSQC)	61.4 (CH ₂)	4.10 (dd, 11.1, 6.8)	61.2 (CH ₂)
6'b	4.13 (HSQC)		4.02 (dd, 11.1, 6.6)	
3''a	2.42 (dd, 13.4, 5.4)	37.6 (CH ₂)	2.52 (dd, 12.9, 5.5)	37.9 (CH ₂)
3''b	1.86 (HSQC)		1.81 (t, 12.45)	
4''	5.50 (ddd, 11.0, 10.7, 5.4)	69.1 (CH)	5.63 (ddd, 11.0, 10.8, 5.5)	69.8 (CH)
5''	3.39 (HSQC)	52.1 (CH)	4.04 (t, 8.9)	51.5 (CH)
5''-NH	6.00 (d, 7.6)	----	4.92 (d, 8.3)	----
6''	3.49 (HSQC)	66.9 (CH)	3.73 (d, 10.9)	67.7 (CH)
7''	3.49 (HSQC)	73.4 (CH)	3.70 (dd, 9.5, 1.7)	73.3 (CH)
7''-OH	overlapped	----	4.95 (d, 4.6)	----
8''	3.49 (HSQC)	76.8 (CH)	3.83 (d, 9.4)	77.3 (CH)
8''-OCH₃	3.44 (s)	57.2 (CH ₃)	3.93 (s)	57.3 (CH ₃)
9''a	4.64 (d, 11.7)	61.0 (CH ₂)	5.20 (d, 12.0)	61.0 (CH ₂)
9''b	4.22 (d, 12.0)		4.50 (d, 11.7)	
2'''	5.17 (HSQC)	74.1 (CH)	5.50 (t, 6.5)	74.4 (CH)
Ac's	2.24(s), 2.23(s), 2.08(s), 2.07(s), 2.06(s), 2.06(s), 2.02(s), 1.97(s)	23.2-20.8 (CH ₃)	2.36 (s), 2.16 (s), 2.02 (s), 1.78(s), 1.77(s), 1.72(s), 1.50(s), 1.38(s)	22.1 –20.1 (CH ₃)

Infine, sul composto **5** è stata effettuata una reazione di deacetilazione per rigenerare i prodotti naturali da utilizzare per i saggi biologici. La procedura di deacetilazione normalmente usata per i glicolipidi prevede la metanolisi basica del glicolipide acetilato. In questo caso, però, tale reazione porterebbe alla formazione di un indesiderato estere metilico del carbossile dell'acido sialico, pertanto la reazione è stata condotta usando come solvente una miscela di acqua e metanolo, ed ha portato all'ottenimento del ganglioside **3**.

Tabella 5.6. Dati NMR del composto **3**

Pos.	CDCl ₃ /CD ₃ OD	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.08(dd, 10.5, 5.4)	69.1 (CH ₂)
1b	3.79 (HSQC)	
2	4.22 (br. q)	50.7 (CH)
3	3.60 (HSQC)	74.8 (CH)
4	3.51 (HSQC)	72.4 (CH)
1'	4.27 (d, 7.8)	104.0 (CH)
2'	3.58 (HSQC)	70.1 (CH)
3'	4.01 (HSQC)	77.1 (CH)
4'	3.92 (br. d, 2.9)	69.0 (CH)
5'	3.48 (HSQC)	75.7 (CH)
6'a	3.77 (HSQC)	62.1 (CH ₂)
6'b	3.67(HSQC)	
3''a	2.68 (dd, 12.7, 3.9)	40.5 (CH ₂)
3''b	1.84 (HSQC)	
4''	3.80 (HSQC)	67.9 (CH)
5''	3.79 (HSQC)	53.2 (CH)
6''	3.71 (HSQC)	74.4 (CH)
7''	3.50 (HSQC)	68.4 (CH)
8''	3.37 (m)	80.4 (CH)
8''-OCH₃	3.43 (s)	58.2 (CH ₃)
9''a	3.89 (dd, 12.2, 3.2)	60.7 (CH ₂)
9''b	3.69 (HSQC)	
2'''	4.00 (HSQC)	72.5 (CH)

5.4.3. Degradazione chimica del ganglioside 3

Per la determinazione della lunghezza delle catene alchiliche del ceramide del composto **3** (che è stato isolato sottoforma delle miscele di omologhi dei suoi peracetil derivati **5** e **7**), e della configurazione assoluta dei centri chirali presenti sul ceramide e degli zuccheri, è stato necessario ricorrere alla degradazione di una piccola quantità di composto, secondo lo schema descritto nel Capitolo 4.

200 µg del composto **3** sono stati sottoposti a metanolisi acida con HCl in MeOH, ed i prodotti della reazione sono stati separati mediante ripartizione tra CHCl₃ e H₂O/MeOH, ottenendo una fase acquosa contenente i glicosidi metilici (frazione A), ed una fase organica (frazione B) contenente gli esteri metilici dei 2-idrossiacidi e le sfinganine.

La frazione B è stata analizzata per GC-MS, ed è stata dimostrata la presenza degli esteri metilici di tre α-idrossiacidi omologhi, attraverso il confronto dei loro tempi di ritenzione e dei loro spettri massa con quelli di campioni autentici (Tabella 5.7).

I prodotti della metanolisi sono stati utilizzati anche per stabilire la stereochimica assoluta dei 2-idrossiacidi, delle sfinganine e degli zuccheri: la Frazione B è stata successivamente perbenzoilata con cloruro di benzoile in piridina, e la miscela di reazione contenente i prodotti perbenzoilati è stata separata attraverso HPLC a fase diretta. Questa separazione ha portato all'ottenimento di due frazioni, una costituita dagli esteri metilici dei 2-benzoilossiacidi (frazione C), e l'altra costituita dalle sfinganine perbenzoilate (frazione D). Il confronto degli spettri CD ed ^1H -NMR della frazione C con quelli di un campione autentico di (*R*)-2-benzoilossibutirrato di metile ha permesso di dedurre la configurazione (*R*) degli esteri metilici dei 2-idrossiacidi ottenuti dal composto **5**. Per quanto riguarda le sfinganine, le configurazioni relative *ribo* delle sfinganine benzoilate sono state determinate registrando lo spettro ^1H NMR della frazione D, che risultava identico a quello di un campione autentico di D-*ribo*-fitosfingosina perbenzoilata. Le loro configurazioni assolute sono poi state dedotte dall'analisi del loro spettro CD, registrato in soluzione di MeCN, che risultava sovrapponibile a

quello di un campione autentico di *D-ribo*-fitosfingosina perbenzoilata registrato nello stesso solvente.

La frazione D, contenente le sfinganine è stata poi sottoposta a metanolisi acida per rimuovere i gruppi benzoilici, e successivamente ad ossidazione di Lemieux con $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$ per convertire le sfinganine in acidi carbossilici con tre atomi di carbonio in meno. Gli acidi grassi ottenuti sono stati metilati con CH_2N_2 , e la miscela di esteri metilici ottenuta è stata analizzata per GC-MS, e si è dimostrata costituita da esteri di acidi grassi *iso* e lineari. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 5.8, sotto forma della struttura delle sfinganine di partenza.

Tabella 5.7. Composizione degli acidi grassi del composto **3**

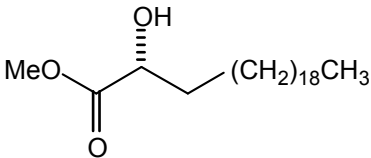
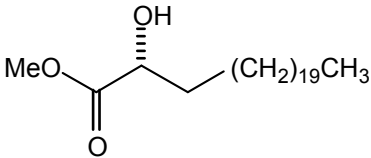
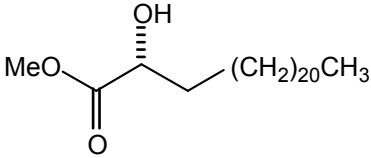
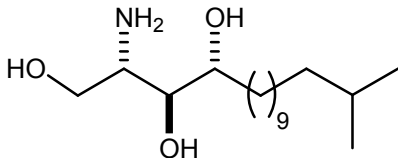
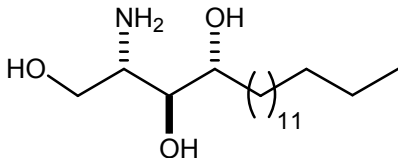
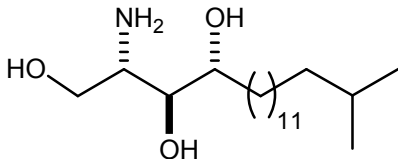
Esteri metilici degli acidi grassi	
	49.1 %
	27.0 %
	23.9 %

Tabella 5.8. Composizione delle sfinganine del composto **3**

Sfinganine	
	33.0%
	25.0 %
	42.0%

Infine, la configurazione assoluta degli zuccheri è stata stabilita sottoponendo i metil glicosidi (la frazione A ottenuta dalla metanolisi) a perbenzoilazione e successiva separazione per HPLC. Il cromatogramma ottenuto conteneva due picchi, che sono stati raccolti ed identificati sulla base sia dei loro rispettivi tempi di ritenzione che del confronto dei loro spettri ^1H NMR e CD con quelli di campioni autentici dei metil glicosidi preparati, seguendo la stessa procedura, rispettivamente dall'acido D-sialico e dal D- galattosio.

5.4.4. Determinazione strutturale del ganglioside 4

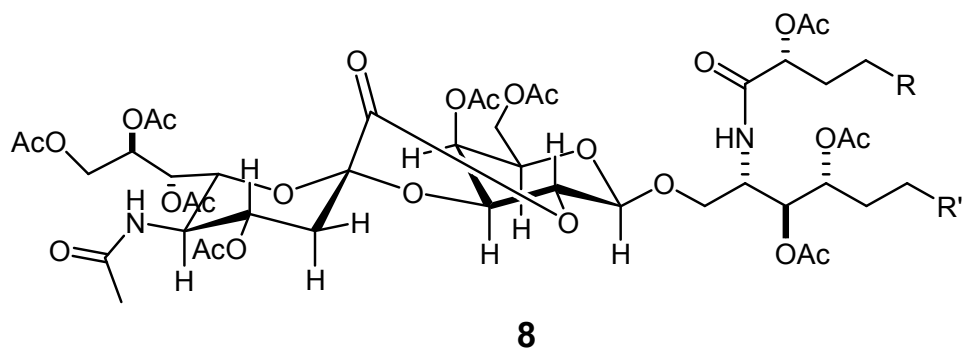
Per la determinazione strutturale del ganglioside **4**, il suo peracetil derivato **8** è stato innanzitutto sottoposto ad esperimenti di spettrometria di massa. Lo spettro di massa ESI del composto **8** presentava una serie di picchi dello ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{Na}]^+$ che differivano tra loro di una unità metilenica (14 amu) a m/z 1408, 1422 e 1436 e 1450. Questo indicava che il composto **8** era costituito da una miscela di omologhi, che, come nel caso del ganglioside **5**, non sono stati ulteriormente separati;

inoltre, la massa di ogni ione risultava minore di 28 uma rispetto ai rispettivi ioni di **5**.

Un'analisi preliminare dello spettro ^1H NMR del composto **8**, registrato in C_6D_6 , ha permesso di identificarne la natura gangliosidica, come mostrato:

1. dai caratteristici segnali dei protoni in posizione 3 dell'acido sialico: un doppio doppietto ($J = 13.5$ e 5.5 Hz) a δ 2.61 (protone equatoriale) ed un tripletto ($J = 13.5$ Hz) a δ 1.84 (protone assiale);
2. da due caratteristici doppietti ammidici a δ 7.65 e δ 4.22.
Il fatto che i doppietti ammidici fossero due era dovuto alla presenza della funzione ammidica dell'acido sialico, oltre alla funzione ammidica del ceramide;
3. da un intenso segnale a δ 1.25 dovuto ai metileni delle catene alchiliche;
4. da dieci singoletti tra δ 2.39 e δ 1.54, corrispondenti ai metili acetilici;
5. da segnali relativi a protoni carbinolici tra δ 5.72 e δ 3.05, dovuti ai protoni degli zuccheri e a quelli della parte polare del ceramide.

Sul composto **8** è stata poi effettuata un'analisi spettroscopica approfondita, in maniera analoga a quanto descritto precedentemente per la determinazione strutturale del composto **5**. In base ai dati ricavati da tale analisi (vedi tabella 5.8) è stato possibile affermare che il ganglioside **8** è molto simile al composto **5**: anche in questo caso il primo zucchero è un β -galattopiranoside, e l'acido sialico è legato alla posizione 3 del β -galattopiranoside, mentre il ceramide risulta costituito da una sfingosina satura triidrossilata acilata da un α -idrossiacido. Così come nel caso del composto **5**, si è osservata la presenza di un anello lattonico tra il gruppo carbossilico dell'acido sialico e l'ossidrile in posizione 2 del β -galattopiranoside. A differenza del composto **5**, però, nel residuo di acido sialico del composto **8** l'ossidrile in posizione 8 non è metilato, e pertanto risulta acetilato, come si può dedurre dal valore di chemical shift di H-8", che risuona a campi notevolmente più bassi del corrispondente protone di **5** (δ 5.59 contro δ 3.96). La struttura del ganglioside peracetilato **8** è pertanto la seguente:



Anche in questo caso, oltre al composto **8**, è stato isolato un altro peracetil derivato del ganglioside **4**, il composto **9**, caratterizzato dall'assenza dell'acetile in posizione 7 dell'acido sialico; anche questo composto presentava un insolito comportamento cromatografico, in quanto veniva eluito con un tempo di ritenzione inferiore rispetto al derivato totalmente acetilato.

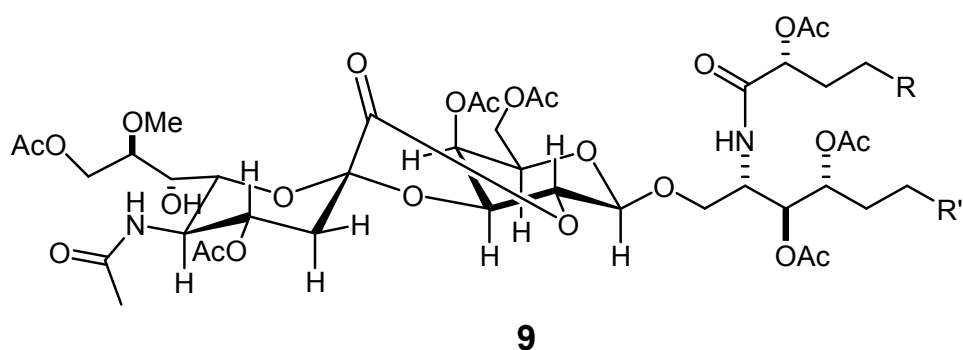


Tabella 5.9. Dati NMR del composto **8**

Pos.	C₆D₆	
	δ_{H} (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_{C} (mult.)
1a	3.95(HSQC)	67.0 (CH ₂)
1b	3.40 (dd, 9.4, 1.4)	
2	4.75 (t, 10.0)	47.8 (CH)
2-NH	7.65 (d, 9.6)	----
3	5.68 (dd, 10.2, 1.7)	70.8 (CH)
4	5.29 (HSQC)	73.2 (CH)
1'	3.93 (HSQC)	98.7 (CH)
2'	4.91 (dd, 10.9, 7.7)	73.7 (CH)
3'	3.12 (dd, 10.9, 3.0)	73.5 (CH)
4'	5.27 (HSQC)	65.8 (CH)
5'	3.30 (t, 6.7)	70.6 (CH)
6'a	4.12 (dd, 11.2, 7.0)	61.0 (CH ₂)
6'b	4.02 (dd, 11.2, 6.6)	
1''	----	164.4 (C)
2''	----	97.7 (C)
3''a	2.61 (dd, 13.5, 5.5)	37.8 (CH ₂)
3''b	1.84 (t, 13.5)	
4''	5.54 (HSQC)	69.5 (CH)
5''	4.28 (HSQC)	49.2 (CH)
5''-NH	4.22 (d, 10.2)	----
6''	3.75 (d, 10.3)	73.0(CH)
7''	5.54 (HSQC)	66.9 (CH)
7''-OH	4.95 (d, 4.6)	----
8''	5.59 (HSQC)	69.7 (CH)
9''a	4.61 (d, 2.8)	62.4 (CH ₂)
9''b	4.61 (d, 2.8)	
1'''	----	170.7 (C)
2'''	5.50 (t, 6.5)	74.7 (CH)
Ac's	2.36 (s), 2.16 (s), 2.02 (s), 1.78(s), 1.77(s), 1.72(s), 1.50(s), 1.38(s)	22.6 –19.9 (CH ₃)

La deacetilazione del ganglioside **8**, condotta utilizzando MeONa in una miscela di H₂O e MeOH, ha infine condotto all'ottenimento del prodotto naturale, il ganglioside **4** (dati ¹H e ¹³C NMR: vedi Tabella 5.10).

Anche per il composto **4** è stata effettuata la degradazione chimica, per stabilire la lunghezza delle catene alchiliche del ceramide, la stereochimica assoluta degli zuccheri e la stereochimica assoluta dei centri chirali della sfingosina e dell' α -idrossiacido, in maniera del tutto analoga a quanto già visto per il composto **5**. Questa analisi ha dimostrato i due composti hanno la stessa stereochimica, e che la composizione in sfingosine ed acidi grassi del composto **4** è praticamente identica a quella del composto **3** (Tabella 5.7 e Tabella 5.8).

Tabella 5.10. Dati NMR del composto **4**

Pos.	CDCl ₃ /CD ₃ OD	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.05(dd, 10.8, 6.2)	68.6 (CH ₂)
1b	3.81 (HSQC)	
2	4.23 (br. q)	50.4 (CH)
3	3.59 (HSQC)	74.6 (CH)
4	3.51 (HSQC)	72.3 (CH)
1'	4.27 (d, 7.7)	103.7(CH)
2'	3.54 (HSQC)	69.8(CH)
3'	3.97 (dd, 9.6, 3.2)	76.6 (CH)
4'	3.88 (d, 2.9)	67.8 (CH)
5'	3.47 (HSQC)	75.7 (CH)
6'a	3.77 (HSQC)	62.0 (CH ₂)
6'b	3.67(HSQC)	
2''	----	100.2 (C)
3''a	2.84 (dd, 12.2, 3.3)	41.5 (CH ₂)
3''b	1.70 (HSQC)	
4''	3.67 (HSQC)	68.2 (CH)
5''	3.67 (HSQC)	53.1 (CH)
6''	3.57 (HSQC)	74.0(CH)
7''	3.46 (HSQC)	69.2 (CH)
8''	3.80 (HSQC)	71.9 (CH)
9''a	3.83 (HSQC)	63.8 (CH ₂)
9''b	3.61 (HSQC)	
2'''	4.02 (dd, 7.9, 3.7)	72.3 (CH)

5.5. Riferimenti bibliografici

1. H. Wiegandt, *Behav. Brain Res.*, **1995**, 66, p.85.
2. A. Irie, H. Kubo, M. Hoshi, *J. Biochem*, **1990**, 107, p.578.
3. R. Misasi, S. Dionisi, L. Farrilla, B. Carabba, L. Lenti, U. Di Mario, F. Dotta, *Diabetes-Metabolism Rev.*, **1997**, 13, p.163.
4. K. Ogawa-Goto, T. Abe, *Neurochem. Rev.*, **1998**, 23, p.305.
5. C.B. Zeller, R.B. Marchase, *Am. J. Physiol.*, **1992**, 262, p.1341.
6. A.C. Cuello, *Adv. Pharmacol.*, **1990**, 1, p.21.
7. C.L. Schengrund, *Brain Res. Bull.*, **1990**, 24, p.131.
8. J.S. Schneider, *CNS Drugs*, **1994**, 1, p.213.
9. F.A. Rodden, H. Wiegandt, B.L. Bauer, *J. Neurosurg*, **1991**, 74, p.606.
10. A. Varki, *Glycobiology*, **1992**, 2, p.25.
11. R. Schauer, S. Kelm, R. Reuter, P. Roggentin, L. Shaw: Biochemistry and role of sialic acids, in *Biology of the sialic acids*; Rosenberg A. Ed.; Plenum Press, New York, **1995**, p.7.
12. L.D. Bergelson, *Immunol. Today*, **1995**, 16, p.483.

13. L.D. Bergelson, E.V. Dyatlovitskaya, T.E. Klychareva, E.V. Kryukova, A.F. Lemenovskaya, V.A. Matveeva, E.V. Sinitsyna, *Eur. J. Immunol.*, **1989**, 19, p.1979.
14. E.V. Dyatlovitskaya, E.V. Kryukova, V.S. Suskova, V.I. Emez, L.D. Bergelson, *Biomed. Sci.*, **1990**, 1, p.397.
15. P.H. Fishman, *J. Membrane Biol.*, **1982**, 69, p.85.
16. J. N. Folkman, *Engl. J. Med.*, **1971**, 285, 1182-1186.
17. M. Ziche, G. Alessandri, P. Gullino, *Laboratory Investigation*, **1989**, 61, p.629.
18. M. Ziche, G. Alessandri, P. Gullino, *Laboratory Investigation*, **1992**, 67, p.711.
19. Z. Lang, M. Guerrera, R. Li, S. Ladisch, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2001**, 282, 1031-1037.
20. M.G. Manfredi, S. Lim, K.P. Claffey, T.N. Seyfried, *Cancer Research*, **1999**, 59, 5392-5397.
21. M. Slevin, S. Kumar, X. He, J. Gaffney, *International Journal of Cancer*, **1999**, 82, 412-423.
22. E. Fattorusso, A. Mangoni in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Eds.: W. Hertz, G.W. Kirby, R. E. Moore, W. Steiglich, Ch. Tamm), Springer-Verlag, Wien, **1997**, 215-301.

23. R. Higuchi, K. Inukai, J.X. Zhou, M. Honda, T. Komori, S. Tsuji, Y. Nagai, *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, p.359.
24. U. Dabrowski, H. Friebohn, R. Bossmer, M. Supp, *Tetrahedron lett.*, **1979**, 463-464.
25. Gillies et al., *Annal Biochem.*, **1986**, 159, 109-113.
26. Lang et al., *BBRC*, **2001**, 282, 1031-1037.
27. Slevin et al., *Int. J. Cancer*, **1999**, 82, 412-423.

6. Cerebrosidi

6.1. Introduzione

I glicosfingolipidi neutri, noti come cerebrosidi, sono comunemente ritrovati quali costituenti cellulari di vari animali marini, mentre è stato sinora riportato l'isolamento di un solo cerebroside da una pianta marina, l'alga rossa *Corallina pirulifera*.¹ Secondo quanto riportato in letteratura, i cerebrosidi mostrano distinti pattern di distribuzione fra le varie specie, ed infatti sono riportati dei casi in cui la struttura e la distribuzione glicolipidica sono state usate per classificazioni tassonomiche.

Il β -glucosilceramide è il cerebroside più comune negli animali marini. I β -glucosilceramidi sono ampiamente distribuiti negli echinodermi (principalmente nelle stelle marine) e sono presenti in alcune specie di spugne; inoltre, sono stati occasionalmente ritrovati in organismi di diversi phyla come artropodi, celenterati e molluschi. I β -galattosilceramidi sono meno diffusi rispetto ai β -glucosilceramidi, e tra gli animali marini essi sono stati ritrovati sinora soltanto in spugne e molluschi.

6.2. Oreacerebrosidi dalla stella *Oreaster reticulatus*

L'analisi della frazione glicolipidica della stella marina *Oreaster reticulatus* ci ha portato all'isolamento degli oreacerebrosidi, un gruppo di GSL neutri in cui è presente una sfingosina triinsatura caratterizzata dalla presenza di un'insolita ramificazione metilica e di un diene coniugato. Sono stati isolati in precedenza altri GSL con sfingosina di questo tipo, ma sempre contenenti come residuo zuccherino un β -glucopiranoside; gli oreacerebrosidi **11a-11f** rappresentano invece il primo esempio di cerebrosidi in cui tale caratteristica sfingosina è associata ad un β -galattopiranoside piuttosto che ad un β -glucopiranoside.

6.2.1. Isolamento degli oreacerebrosidi 10a-11f

Alcuni esemplari della stella marina *Oreaster reticulatus*, raccolti a Grand Bahamas Island (Sweeting Cay) nel Giugno 2003, sono stati congelati subito dopo la raccolta e tenuti in freezer fino al momento dell'analisi. L'organismo è stato sottoposto alla procedura di estrazione, cromatografia su colonna impaccata con gel di silice RP-18 e ripartizione tra $H_2O/MeOH/CHCl_3$ descritta nel dettaglio nel capitolo precedente

per l'ottenimento di frazioni contenenti gangliosidi. Per ottenere la frazione contenente i glicolipidi neutri della stella, l'analisi chimica è però proseguita sulla fase cloroformica derivante da questa ripartizione. Tale fase cloroformica è stata ulteriormente sottoposta a cromatografia su SiO₂ ottenendo una frazione eluita con AcOEt/MeOH (7:3), composta principalmente di glicolipidi neutri. Tale frazione è stata peracetilata con Ac₂O in piridina, ed i glicolipidi acetilati sono stati separati tramite HPLC su colonna di SiO₂ utilizzando come eluente una miscela *n*-esano/AcOEt (7:3). Da tale separazione è stata ottenuta una miscela di tre differenti cerebrosidi caratterizzati dalla presenza di un solo zucchero nella porzione saccaridica. Questa miscela è stata ulteriormente cromatografata tramite HPLC su colonna di SiO₂ utilizzando come eluente una miscela *n*-esano/isopropanolo (95:5); da questa separazione sono stati ottenuti una frazione contenente β-galattosilceramide (in cui la LCB era rappresentata da una fitosfingosina) in forma pura, e una miscela che da una preliminare analisi spettroscopica risultava composta da due GSL differenti per la natura dello zucchero, e identici nella

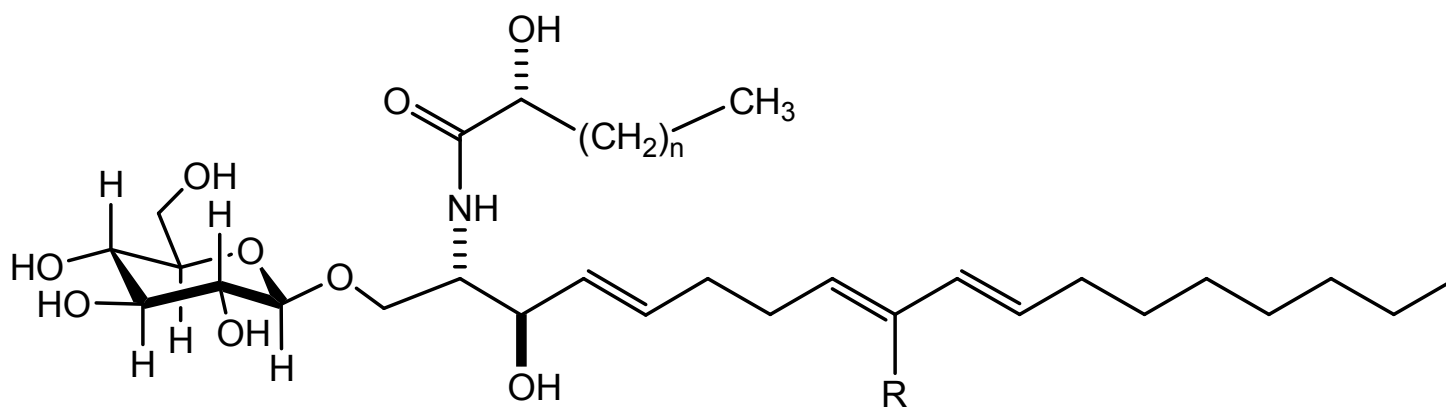
struttura del ceramide, essendo completamente sovrapponibili tutte le risonanze relative a questa porzione della molecola.

Non essendo risultato possibile separare tali GSL come derivati peracetilati, si è quindi proceduto alla reazione di deacetilazione della miscela ed alla sua definitiva risoluzione tramite HPLC su colonna di SiO₂ utilizzando come eluente una miscela *n*-esano/isopropanolo (7:3). Questa separazione ha permesso di ottenere due frazioni, A e B, omogenee per quanto riguardava la parte saccaridica delle molecole, ma contenenti ceramidi con differenti catene alchiliche. Infatti nello spettro di massa ESI della Fr.A, registrato in soluzione di MeOH contenente LiCl 1 mM,² erano presenti quattro picchi dello ione pseudomolecolare $[M+Li]^+$ distanziati l'uno dall'altro da 14 amu, il che è indicativo della presenza di omologhi che differiscono tra di loro per un'unità metilenica (o una ramificazione metilica). Inoltre, nello spettro protonico della Fr.A era presente un singoletto a δ 1.72, che è un valore tipico dei metili che si trovano su doppi legami, il cui integrale non corrispondeva ad un numero intero di protoni: questo indicava che una ramificazione metilica era presente, ma solo su alcuni dei ceramidi appartenenti

ai GSL che componevano la Fr.A. Anche per la Fr.B, lo spettro ^1H NMR dimostrava la presenza di una miscela di GSL con ceramidi metilati e non, e lo spettro di massa ESI la presenza di omologhi, il cui peso molecolare risultava lo stesso di quelli dei GSL contenuti nella Fr.A.

6.2.2. Purificazione e determinazione strutturale degli oreocerebrosidi 10a-10f

Una ulteriore separazione per HPLC, stavolta a fasi inverse su colonna RP-18 (eluente MeOH 100%), cui è stata sottoposta la Frazione A ha permesso di ottenere 4 frazioni contenenti i composti **10a-10f**. Il primo e l'ultimo picco del cromatogramma corrispondevano a composti puri (rispettivamente **10a** e **10f**), come dimostrato dagli spettri ^1H NMR e dagli spettri di massa ESI delle due frazioni, che mostravano un solo picco dello ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{Li}]^+$ a massa 802.7 (**10a**) e 844.6 (**10f**). Gli altri due picchi del cromatogramma, pur mostrando un solo picco dello ione pseudomolecolare nello spettro di massa ESI, risultavano invece miscele di GSL isomeri (**10b** + **10c** e **10d** + **10e**), come dimostrato dagli spettri ^1H NMR delle due frazioni, che erano simili a quelli della frazione di partenza e mostravano



10

- | | | |
|---|-------------------|------|
| a | R=H | n=19 |
| b | R=CH ₃ | n=19 |
| c | R=H | n=20 |
| d | R=CH ₃ | n=20 |
| e | R=H | n=21 |
| f | R=CH ₃ | n=21 |

quindi la presenza contemporanea di ceramidi metilati e non metilati.

Per quanto riguarda la determinazione strutturale del composto **10f**, è stato innanzitutto registrato il suo spettro di massa ESI ad alta risoluzione, che mostrava un intenso picco dello ione pseudomolecolare $[M+Li]^+$ a m/z 844.6863, in accordo con la formula molecolare $C_{49}H_{91}NO_9$ (il valore calcolato per $C_{49}H_{91}LiNO_9^+$ è 844.6848). Il composto **10f** è stato poi identificato come ophidiacerebroside E, un glucosilceramide con sfingosina triinsatura isolato dalla stella marina *Ophidiaster ophidiamus*,³ per confronto dei segnali negli spettri 1H e ^{13}C , che risultavano avere per i due composti gli stessi chemical shift e molteplicità (tabella 6.1). Sulla base di questi dati, si poteva asserire che **10f** aveva la stessa struttura planare e stereochimica relativa dell'ophidiacerebroside E, fatta eccezione per la lunghezza delle catene alchiliche del ceramide, che non può essere stabilita dal solo confronto dei dati NMR. Questa informazione è stata ricavata da un esperimento ESI MS/MS: il picco di frammentazione a m/z 478.0, originato dalla perdita del residuo di α -idrossiacido, dimostrava la presenza in **10f** di una

sfingosina a 19 atomi di carbonio, così come nell'ophidiacerebroside E. Tale dato era anche confermato da un ulteriore picco di frammentazione a m/z 416.3, originato dalla perdita del residuo saccaridico e di 17 dei 19 atomi di carbonio della sfingosina (Figura 6.1).

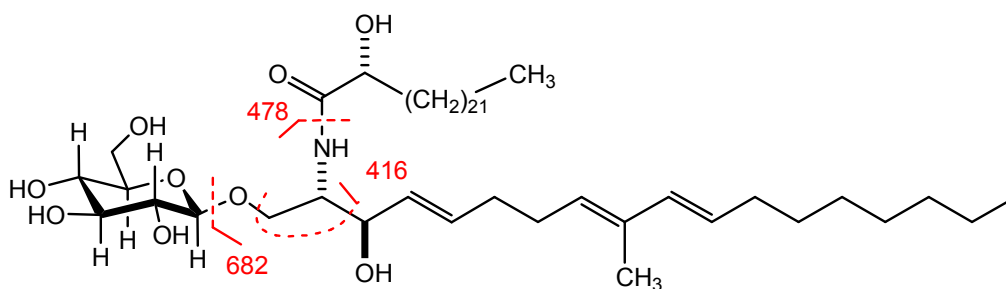


Figura 6.1. Frammentazione del composto **10f**

Anche la stereochimica assoluta sia del ceramide che della parte zuccherina dei due composti risultava la stessa, come dimostrato dal confronto del potere ottico rotatorio di **10f** ($[\alpha]_D^{25}=+8.6^\circ$) con quello riportato per il phalluside **3** ($[\alpha]_D^{25}=+9.4^\circ$), un cerebroside isolato dall'ascidia *Phallusia fumigata*⁴ che differisce da **10f**, e quindi dall'ophidiacerebroside E, soltanto per la lunghezza del residuo di acido grasso.

Tabella 6.1. Dati NMR del composto **10f** (CD₃OD)

Pos.	CD ₃ OD	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	3.68 (dd, 10.3, 3.5)	69.3 (CH ₂)
1b	4.10 (dd, 10.3, 5.3)	
2	3.97 (overlapped)	54.1 (CH)
3	4.12 (dd, 7.2, 7.1)	72.8 (CH)
4	5.48 (dd, 15.3, 7.2)	129.8 (CH)
5	5.72 (dt, 15.3, 6.3)	134.2 (CH)
6	2.09 (m)	33.7 (CH ₂)
7	2.20 (m)	35.4 (CH ₂)
8	5.33 (t, 6.9)	128.4 (CH)
9	----	134.8 (C)
10	6.01 (d, 15.3)	135.6 (CH)
11	5.53 (dt, 15.3, 6.6)	130.6 (CH)
12	2.07 (m)	33.2 (CH ₂)
13	1.37 (m)	33.2 (CH ₂)
14-15	1.27 (m)	33.2 (CH ₂)
16	1.27 (HSQC)	32.7 (CH ₂)
17	1.27 (HSQC)	23.4 (CH ₂)
18	0.88 (t, 6.8)	14.4 (CH ₃)
19	1.69 (s)	12.8 (CH ₃)
1'	4.24 (d, 7.7)	104.1 (CH)
2'	3.15 (dd, 8.9, 7.7)	74.4 (CH)
3'	overlapped	77.4 (CH)
4'	overlapped	71.0 (CH)
5'	overlapped	77.4 (CH)
6'a	3.64 (dd, 11.8, 3.3)	62.2 (CH ₂)
6'b	3.84 (br.d, 11.8)	
1''	----	176.7 (C=O)
2''	3.97 (m)	72.5 (CH)
3''a	1.67 (m)	35.6 (CH ₂)
3''b	1.57 (m)	

L'analisi è poi proseguita sull'altro composto ottenuto in forma pura, ossia **10a**. Sulla base dei dati ricavati dallo spettro di massa ESI ad alta risoluzione, era possibile affermare che il composto **1a** possedeva 3 atomi di carbonio in meno rispetto ad **10f** (ione pseudomolecolare $[M+Li]^+$ a m/z 802.6364, in accordo con la formula molecolare $C_{46}H_{85}NO_9$). Inoltre, nello spettro 1H NMR di **10a** era assente il segnale relativo al metile sul doppio legame (C-19), mentre la regione relativa ai protoni olefinici risultava notevolmente diversa rispetto alla stessa regione dello spettro 1H NMR di **10f**, essendo in questo caso presenti segnali relativi a 6 protoni su carboni sp^2 , contro i 5 protoni su carboni sp^2 in **10f**. Anche gli spettri $^{13}C/DEPT$ dei due composti risultavano diversi: per **10a** erano evidenti i segnali di 6 CH olefinici, mentre per **10f** i segnali di 5 CH olefinici e di 1 C sp^2 non protonato. Tali dati (tabella 6.2), insieme all'analisi degli accoppiamenti vicinali $^1H-^1H$ osservabili nello spettro COSY e degli accoppiamenti long-range $^{13}C-^1H$ osservabili nello spettro HMBC, hanno permesso di stabilire che il composto **10a** differiva dal composto **10f** per l'assenza del metile in posizione 19 sulla sfingosina, oltre che per la lunghezza di una o entrambe

le catene alchiliche del ceramide, come era facilmente deducibile dalla differente formula molecolare dei due composti. Anche la configurazione dei carboni chirali C-2, C-3 e C-2" del ceramide è la stessa che in **10f**, poiché negli spettri ^1H e ^{13}C NMR i segnali di questa porzione della molecola erano esattamente coincidenti nei due composti.

Anche in questo caso, per definire la lunghezza delle catene alchiliche della sfingosina e dell' α -idrossiacido, è stato utilizzato un esperimento ESI MS/MS; il picco di frammentazione a m/z 464.3, originato dalla perdita dell' α -idrossiacido, e quello a m/z 388.4, originato dalla perdita del residuo zuccherino e di parte della catena alchilica della sfingosina, hanno consentito di determinare che la sfingosina era costituita da 18 atomi di carbonio, mentre l' α -idrossiacido aveva una catena C-22 (Figura 6.2).

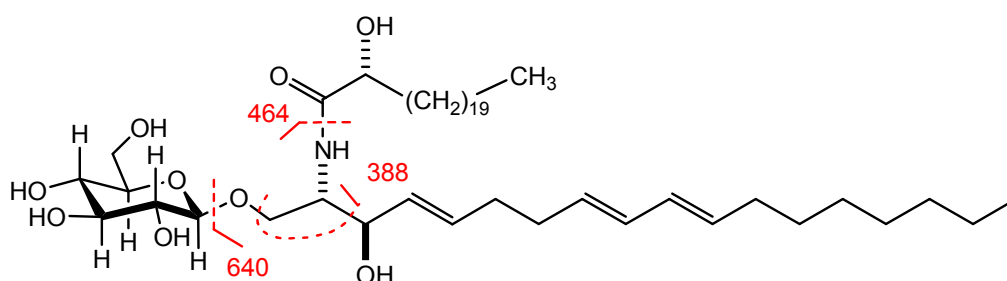


Figura 6.2. Frammentazione del composto **10a**

Tabella 6.2. Dati NMR del composto **10a** (CD₃OD)

Pos.	CD ₃ OD	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.13 (dd, 10.3, 5.4)	69.4 (CH ₂)
1b	3.71 (dd, 10.4, 3.6)	
2	3.99 (overlapped)	54.3 (CH)
3	4.15 (t, 7.6)	72.5 (CH)
4	5.49 (dddd, 15.4, 7.4, 1.2, 1.2)	131.2 (CH)
5	5.74 (dddd, 15.4, 6.3, 6.3, 1.0)	133.9 (CH)
6	2.10 (br.quartet, 7.9)	33.2 (CH ₂)
7	2.23 (br.quartet, 7.6)	28.5 (CH ₂)
8	5.56 (m)	131.8 (CH)
9	5.98 (m)	131.5 (CH)
10	6.00 (m)	132.0 (CH)
11	5.55 (m)	133.2 (CH)
12	2.08 (br.quartet, 7.5)	33.7 (CH ₂)
13	1.39 (HSQC)	30.6 (CH ₂)
16	1.28 (HSQC)	32.7 (CH ₂)
17	1.32 (HSQC)	23.4 (CH ₂)
18	0.90 (t, 7.1)	14.2 (CH ₃)
19	1.72 (br.s)	12.5 (CH ₃)
1'	4.22 (d, 7.6)	105.0 (CH)
2'	3.52 (dd, 9.8, 7.6)	72.2 (CH)
3'	3.47 (dd, 9.8, 3.3)	74.5 (CH)
4'	3.82 (dd, 3.3, 1.0)	70.0 (CH)
5'	3.52 (ddd, 7.1, 5.1, 1.0)	76.5 (CH)
6'a	3.77 (dd, 11.4, 7.1)	62.3 (CH ₂)
6'b	3.71 (dd, 11.4, 5.1)	
1''	----	177.0 (C=O)
2''	3.99 (dd, 7.9, 3.9)	72.8 (CH)
3''a	1.70 (m)	35.6 (CH ₂)
3''b	1.56 (m)	

La struttura del composto **10a** ricavata dai dati appena riportati risulta mai riportata precedentemente in letteratura, ma molto simile a quella del phalluside 4 isolato dall'ascidia *Phallusia fumigata*;⁴ i due composti differiscono per la lunghezza dell' α -idrossiacido, che presenta 18 atomi di carbonio nel phalluside 4, e 22 atomi di carbonio in **10a**.

Come già accennato in precedenza, i cerebrosidi isomeri **10b** e **10c** sono stati isolati come miscela non ulteriormente separabile. Il picco dello ione pseudomolecolare $[M+Li]^+$ a m/z 816.6563 nello spettro di massa ESI ad alta risoluzione era in accordo con la formula molecolare $C_{47}H_{87}NO_9$, pertanto i composti isomeri **10b** e **10c** presentano, nella loro struttura, un'unità metilenica in più rispetto ad **10a**. Lo spettro 1H NMR della miscela appariva come la sovrapposizione degli spettri 1H NMR dei composti **10a** ed **10f**, il che indicava che le sfingosine di **10b** e **10c** erano simili, rispettivamente, a quella di **10f** (che presenta la ramificazione metilica sul C-9), e a quella di **10a** (caratterizzata dalla presenza di un protone sul C-9). Nello spettro ESI MS/MS della miscela composta da **10b** e **10c** erano presenti due picchi di frammentazione relativi alla perdita di α -

idrossiacido, a m/z 478.3 e a m/z 463.9, e due picchi di frammentazione relativi alla perdita dello zucchero e di parte della sfingosina, a m/z 401.9 e m/z 388.6 (Figura 6.3). Questi dati permettevano di ipotizzare che i composti **10b** e **10c** contenessero, rispettivamente, un ceramide composto dalla stessa sfingosina metilata a 19 atomi di carbonio di **10f** e da un α -idrossiacido a 22 atomi di carbonio, ed un ceramide composto dalla stessa sfingosina a 18 atomi di carbonio di **10a** e da un α -idrossiacido a 23 atomi di carbonio.

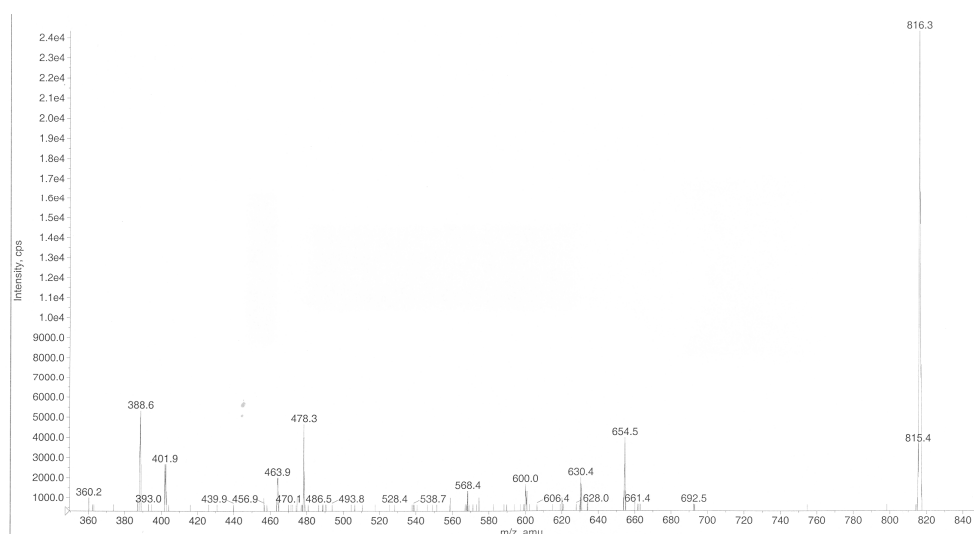


Figura 6.3. Spettro ESI MS/MS della miscela dei composti **10b+10c**

L'analisi della miscela non separabile costituita dai composti **10d** e **10e** è stata effettuata in maniera analoga: **10d** e **10e** risultavano

isomeri sulla base dei dati ricavati dallo spettro di massa ESI ad alta risoluzione, in cui era presente un unico picco dello ione pseudomolecolare $[M+Li]^+$ a m/z 830.6686, corrispondente alla formula molecolare $C_{48}H_{89}NO_9$; tale dato permetteva anche di affermare che nella struttura dei composti **10d** e **10e** era presente un'unità metilenica in più rispetto ai composti **10b** e **10c**. Inoltre, analogamente a quanto appena descritto per i composti **10b** e **10c**, i picchi di frammentazione nello spettro ESI MS/MS a m/z 478.2, m/z 464.3, m/z 416.3, e m/z 402.5 (Figura 6.4) suggerivano che il ceramide del composto **10d** fosse costituito da

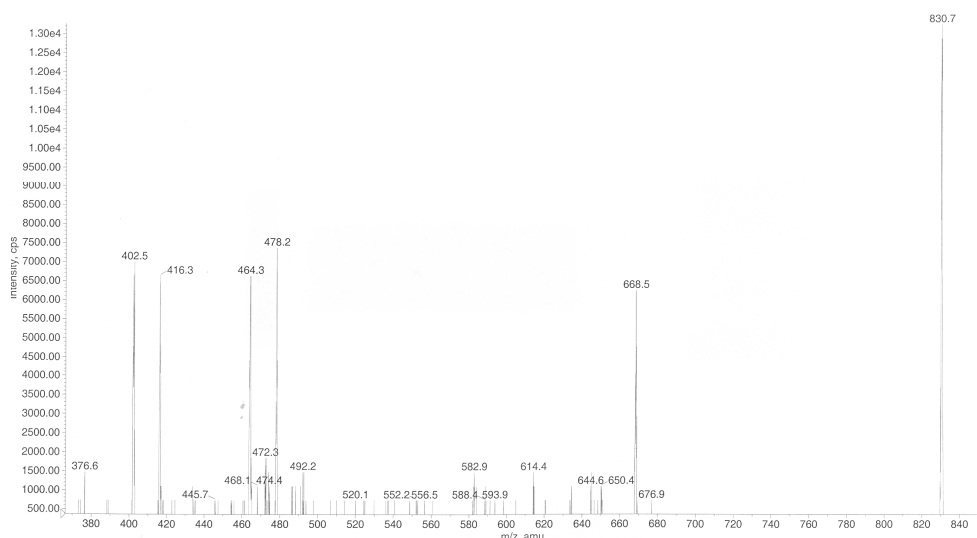


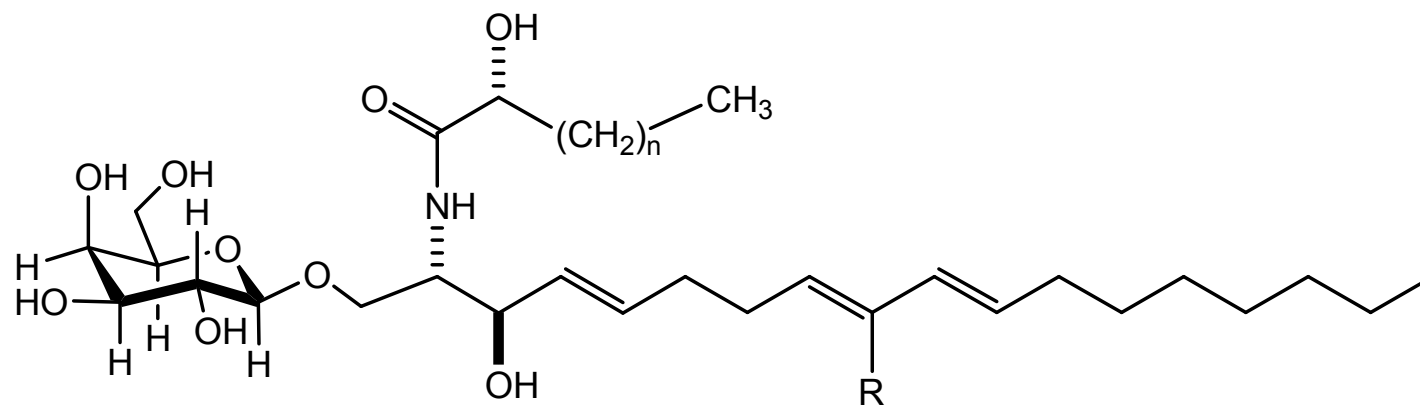
Figura 6.4. Spettro ESI MS/MS della miscela dei composti **10d+10e**

una sfingosina a 19 atomi di carbonio metilata in posizione 9 e da un α -idrossiacido a 23 atomi di carbonio, e che il ceramide del composto **10e** fosse costituito da una sfingosina a 18 atomi di carbonio senza metile e da un α -idrossiacido a 24 atomi di carbonio.

6.2.3. Purificazione e determinazione strutturale degli oreacerebrosidi 11a-11f

Anche la Frazione B è stata sottoposta ad una ulteriore separazione per HPLC a fasi inverse su colonna RP-18 (eluente MeOH 100%). Analogamente a quanto avvenuto per la Fr. A, da tale separazione si sono ottenute 4 frazioni contenenti i composti **11a-11f**; i composti **11a** e **11f** sono stati isolati in forma pura, mentre le altre due frazioni risultavano costituite da 2 miscele di isomeri (**11b** + **11c** e **11d** + **11e**).

È stato poi possibile determinare che il composto **11f** è un isomero di **10f**, e che i due composti differiscono per la natura del residuo zuccherino, ma presentano la stessa parte ceramidica, come dimostrato dall'analisi condotta su **11f** tramite



11

- | | | |
|---|-------------------|------|
| a | R=H | n=19 |
| b | R=CH ₃ | n=19 |
| c | R=H | n=20 |
| d | R=CH ₃ | n=20 |
| e | R=H | n=21 |
| f | R=CH ₃ | n=21 |

spettroscopia sia NMR che MS/MS: particolarmente significativo in questo senso risultava lo spettro di MS/MS di **11f**, che mostrava esattamente gli stessi picchi di frammentazione dello ione pseudomolecolare $[M+Li]^+$ presenti nello spettro di MS/MS di **10f**.

Il residuo zuccherino presente in **11f** è stato identificato come β -galattopiranoside sulla base delle seguenti evidenze spettroscopiche: innanzitutto il protone anomeroico H-1' è stato identificato dal suo picco di correlazione nello spettro HSQC con il carbonio anomeroico C-1', che risuona al caratteristico valore di δ 105.0. A partire da questo protone, attraverso lo spettro COSY, è stato possibile identificare tutti gli altri protoni dello zucchero, che risultavano essere 4 protoni ossimetinici e 2 protoni ossimetilenici, e pertanto si è potuto stabilire che lo zucchero in questione era un aldoesoso.

Successivamente, il picco di correlazione tra il protone H-1' ed il carbonio C-5' nello spettro HMBC ha permesso di dimostrare che questo aldoesoso si trovava in forma piranosica, mentre i picchi di correlazione tra i protoni H-1a ed H-1b ed il

carbonio C-1' confermavano che tale esopiranosio era legato al C-1 della sfingosina.

La stereochimica relativa dello zucchero, come di consueto per i piranosio, è stata poi stabilita tramite l'analisi delle costanti di accoppiamento vicinali ^1H - ^1H (tabella 6.3). In particolare, le costanti di accoppiamento grandi tra H-1' e H-2' (7.6 Hz) e tra H-2' e H-3' (9.8 Hz) dimostravano che questi tre protoni si trovavano tutti in posizione assiale; al contrario, la costante di accoppiamento piccola (3.3 Hz) tra H-3' e H-4' dimostrava che il protone H-4' era equatoriale, e, di conseguenza, che il relativo OH era assiale. Infine, l'orientazione del protone H-5' è stata determinata in base al picco di correlazione tra H-1' e H-5' nello spettro ROESY, che ha permesso di stabilire che entrambi questi protoni erano assiali. In definitiva, in base a questi dati si è potuto determinare che il residuo zuccherino presente in **11f** consisteva in un β -galattopiranoside.

L'analisi spettroscopica condotta sui composti **11a-11e** ha infine dimostrato che questi sono i rispettivi analoghi dei composti **10a-10e** contenenti però β -galattosio come residuo zuccherino. La struttura dei composti **11a-11e** è stata stabilita

sulla base del confronto dei loro spettri ^1H -NMR e ^{13}C -NMR e dei loro spettri ESI MS e MS/MS con quelli di **11f**, in maniera del tutto analoga a quanto descritto precedentemente per la determinazione strutturale dei composti **11a-11e**.

Tabella 6.3. Dati NMR del composto **11f** (CD₃OD)

Pos.	CD ₃ OD	
	δ_H (mult., <i>J</i> [Hz])	δ_C (mult.)
1a	4.13 (dd, 10.3, 5.4)	69.4 (CH ₂)
1b	3.71 (dd, 10.4, 3.6)	
2	3.99 (overlapped)	54.3 (CH)
3	4.15 (t, 7.6)	72.5 (CH)
4	5.50 (dddd, 15.3, 7.3, 1.5, 1.5)	131.1 (CH)
5	5.74 (dddd, 15.3, 6.6, 6.6, 1.0)	134.0 (CH)
6	2.10 (br.quartet, 7.9)	33.2 (CH ₂)
7	2.23 (br.quartet, 7.6)	28.5 (CH ₂)
8	5.36 (br.t, 7.1)	130.0 (CH)
9	----	135.0 (C)
10	6.03 (br.d, 15.3)	135.9 (CH)
11	5.55 (ddd, 15.5, 7.0, 7.0)	128.2 (CH)
12	2.08 (br.quartet, 7.5)	33.7 (CH ₂)
13	1.39 (HSQC)	30.6 (CH ₂)
16	1.28 (HSQC)	32.7 (CH ₂)
17	1.32 (HSQC)	23.4 (CH ₂)
18	0.90 (t, 7.1)	14.2 (CH ₃)
19	1.72 (br.s)	12.5 (CH ₃)
1'	4.22 (d, 7.6)	105.0 (CH)
2'	3.52 (dd, 9.8, 7.6)	72.2 (CH)
3'	3.47 (dd, 9.8, 3.3)	74.5 (CH)
4'	3.82 (dd, 3.3, 1.0)	70.0 (CH)
5'	3.52 (ddd, 7.1, 5.1, 1.0)	76.5 (CH)
6'a	3.77 (dd, 11.4, 7.1)	62.3 (CH ₂)
6'b	3.71 (dd, 11.4, 5.1)	
1''	----	177.0 (C=O)
2''	3.99 (dd, 7.9, 3.9)	72.8 (CH)
3''a	1.70 (m)	35.6 (CH ₂)
3''b	1.56 (m)	

6.2.4. Determinazione della stereochimica assoluta degli oreacerebrosidi 11a-11f

Per la determinazione della stereochimica della parte ceramidica del composto **11f** (così come dei composti **11a-11e**), gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ di **11f** sono stati confrontati con quelli di **10f**, e, siccome i chemical shift e la molteplicità osservata negli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ dei due composti erano pressoché identici, si è potuto dedurre che **10f** e **11f** presentano la stessa stereochimica.

Per quanto riguarda invece la determinazione della stereochimica assoluta del residuo zuccherino presente in **11f** (e nei composti **11a-11e**) è stato necessario utilizzare degradazione chimica su piccolissima scala. A questo scopo si è utilizzata l'intera frazione B, i cui componenti avevano tutti la stessa parte zuccherina. Una piccolissima quantità (100 μg) della Frazione B è stata sottoposta a metanolisi acida con una soluzione 1M di HCl in MeOH al 91%. La successiva ripartizione tra CHCl_3 e $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ (8:2) della miscela di reazione risultante ha permesso di separare i metil glicosidi ottenuti (fase acquosa) dalla parte agliconica della molecola (fase organica); tali metil glicosidi sono stati poi perbenzoilati con cloruro di benzoile in

piridina, aggiungendo in questo modo agli zuccheri un cromoforo che ha permesso di poterli analizzare mediante spettroscopia CD.

I metil glicosidi perbenzoilati sono stati poi purificati per HPLC, ed una delle frazioni così ottenute è stata identificata come metil 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-galattopiranoside sulla base del confronto del tempo di ritenzione e dello spettro CD di tale composto con quelli di un campione autentico ottenuto, con lo stesso procedimento, a partire da D-galattosio. Essendo lo spettro CD del metil glicoside perbenzoilato ottenuto a partire dalla Frazione B identico a quello del corrispondente glicoside sintetico, è stato pertanto dimostrato che la stereochimica assoluta dello zucchero presente nel composto **11f** e del glicoside di riferimento è la stessa.

Gli organismi marini contengono spesso cerebrosidi con una caratteristica sfingosina triinsatura in posizione 4, 8, 10. Tuttavia, tutti i composti appartenenti a questa categoria finora isolati contenevano come residuo zuccherino un β -glucopiranoside; il composto **11f** (così come i composti **11a-11e**) rappresenta invece il primo esempio di cerebroside in cui tale

caratteristica sfingosina è associata ad un β -galattopiranoside piuttosto che ad un β -glucopiranoside.

6.3. Riferimenti bibliografici

1. R. Hishida, H. Shirahama, T. Matsumoto, *Chem. Lett.*, **1993**, p.9
2. F. Hsu, J. Turk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12, 61-79.
3. W. Jin, L. Kenneth, Rinehart, E.A. Jares-Erijman, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 144-147.
4. R. Duràn, W. Zubia, M.J. Ortega, S. Naranjo, J. Salvà, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 14597-14602.

PARTE III

PROCEDURE SPERIMENTALI

7. Metodi generali

7.1 Introduzione

Gli spettri di massa ad impatto elettronico sono stati registrati a 70 eV su uno spettrometro VG Trio 2000. Gli spettri ad alta risoluzione ESI-MS sono stati eseguiti su uno spettrometro di massa Applied Biosystems Mariner API-TOF.

Gli esperimenti ESI-MS/MS sono stati eseguiti con uno spettrometro di massa Finnigan LCQ a trappola ionica. Alcuni spettri sono stati registrati attraverso infusione nella sorgente ESI, utilizzando come solvente MeOH contenente 1mM di LiCl. I poteri ottici rotatori sono stati misurati su un polarimetro Perkin-Elmer 192, con una lampada al sodio operante a 589 nm ed una cella da 10 cm. Gli spettri di dicroismo circolare (CD) sono stati registrati su uno spettrofotometro Jasco J710 in soluzione di MeOH. Tutti gli esperimenti NMR sono stati effettuati su uno spettrometro Varian UnityInova a 500.13 e 125.77 MHz ed il chemical shift è stato espresso in ppm. I chemical shift sono riferiti al segnale residuo del solvente (CDCl_3 : δ_{H} 7.26, δ_{C} 77.0; C_6D_6 : δ_{H} 7.15, δ_{C} 128.0; CD_3OD :

δ_{H} 3.31, δ_{C} 49.0; piridina- d_5 : δ_{H} 8.71, 7.58 e 7.20, δ_{C} 149.0, 135.0 e 123.0). Gli atomi di carbonio metilici, metilenici e metinici sono stati distinti per mezzo di esperimenti DEPT. Gli esperimenti bidimensionali COSY sono stati registrati in valore assoluto. Gli esperimenti 2D TOCSY sono stati effettuati in maniera *phase-sensitive* (TPPI), usando la sequenza MLEV-17 durante il mixing time (100-125 ms). Gli esperimenti 2D ROESY sono stati effettuati in modo TPPI con un mixing time di 500 ms ed un campo di spin-lock di 2000 Hz. Le correlazioni eteronucleari *reverse detected* HSQC sono state registrate usando la sequenza sviluppata da Bax e Subramanian, con un BIRD pulse 0.45 s prima di ogni scansione per sopprimere il segnale dei protoni non direttamente legati al ^{13}C . Gli intervalli tra gli impulsi sono stati ottimizzati per una $^1J_{\text{CH}}$ di 142 Hz. Durante l'acquisizione è stato effettuato il disaccoppiamento del ^{13}C per mezzo della sequenza GARP. Le correlazioni eteronucleari *long-range* HMBC sono state acquisite senza disaccoppiamento del ^{13}C , ed ottimizzate per una $^{2,3}J_{\text{CH}}$ di 8.3 Hz.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è stata realizzata con un'apparecchiatura Varian Prostar 2510 equipaggiata con un rivelatore a indice di rifrazione Varian Star 350 o un detector UV Varian 350.

Gli esperimenti di GC-MS sono stati effettuati con un gascromatografo Hewlett-Packard 5890, usando come rivelatore uno spettrometro di massa MSD HP 5970 MS e un iniettore split/splitless. È stata usata una colonna di silice fusa HP-5 (cross-linked 25 % Ph Me silicone, spessore 0.33 mm) di 25 m × 0.20 mm. La temperatura della colonna è stata portata, dopo un intervallo di 3 min dall'iniezione, da 150 °C a 300 °C ad una velocità di 10 °C min⁻¹. L'analisi quantitativa è stata basata sull'area dei picchi GC.

7.2. Gangliosidi da *Paracentrotus lividus*

Raccolta, estrazione e procedure di isolamento. I ricci, provenienti da Trani (Bari), e di peso pari a circa 3.0 Kg, sono stati scongelati e frantumati con tutto il guscio. Così sminuzzati, sono stati sottoposti ad un processo estrattivo che ha previsto tre estrazioni con MeOH 100%, quattro con miscele di MeOH/CHCl₃ (due estrazioni con MeOH/CHCl₃ in rapporto 2:1 e due con MeOH/CHCl₃ in rapporto 1:2) ed infine tre estrazioni con CHCl₃ 100%. Gli estratti metanolici sono stati riuniti e concentrati sottovuoto per dare 111.96 g di estratto che è stato sottoposto a ripartizione tra H₂O e BuOH; dopo quattro lavaggi della fase acquosa, la fase butanolica è stata concentrata sottovuoto ed è stata riunita all'estratto cloroformico per dare un denso olio di colore marrone scuro dopo evaporazione del solvente. Dell'estratto organico totale, di peso pari a 73.01 g, è stata effettuata una divisione volumetrica: ne sono stati prelevati 9.64 g che sono stati sottoposti a cromatografia su colonna impaccata con gel di silice RP-18. Sono state eluite sette frazioni [eluenti: H₂O/MeOH (9:1); H₂O/MeOH (7:3); H₂O/MeOH (4:6);

H₂O/MeOH (2:8); H₂O/MeOH (1:9); MeOH/CHCl₃ (9:1), CHCl₃ 100%, rispettivamente]. La frazione eluita con CHCl₃, di peso pari a 702.6 mg, è stata sottoposta ad una ripartizione con CHCl₃/MeOH/H₂O nei rapporti, rispettivamente, 8:4:3; le due fasi sono state raccolte separatamente, concentrate a pressione ridotta e pesate (peso fase acquosa: 63.6 mg; peso fase organica: 644.6 mg). La fase acquosa è stata sottoposta ad una cromatografia su colonna a scambio ionico. La colonna è stata impaccata, dopo aver rigonfiato e lavato la resina (7.62 g di Sephadex A-25), riempiendola prima per circa 1/3 della sua altezza con il primo eluente (MeOH/CHCl₃/H₂O in rapporto 60:30:8), e poi versando la resina e lasciando impaccare per circa due ore.

Il campione viene caricato dopo averlo disciolto in 50 ml del primo eluente e lo schema di eluizione procede come già descritto (vedi Capitolo 5). La frazione eluita con CHCl₃/MeOH/0.5M CH₃COONa in H₂O di peso pari a 132.9 mg ed ottenuta sulla base di analisi di tipo TLC, è stata sottoposta ad una cromatografia su colonna ad esclusione molecolare per rimuovere il sale. La colonna è stata impaccata con resina

Sephadex LH-20 precedentemente messa a rigonfiare per una notte con MeOH 100%. In seguito il campione, disciolto in metanolo, è stato caricato, eluito sempre con MeOH 100% e sono state raccolte 20 frazioni di 10 ml ciascuna. Tale separazione ci ha permesso di ottenere un'unica frazione desalificata, di peso pari a 6.6 mg, contenente il ganglioside **1**.

Successivamente, la frazione eluita con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/8.0\text{M}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in H_2O , di peso pari a 59,5 mg ed ottenuta sulla base di analisi di tipo TLC, è stata sottoposta ad una cromatografia su colonna ad esclusione molecolare per rimuovere il sale. La colonna è stata impaccata con resina Sephadex LH-20 precedentemente messa a rigonfiare per una notte con MeOH 100%. In seguito il campione, disciolto in metanolo, è stato caricato, eluito sempre con MeOH 100% e sono state raccolte 20 frazioni di 10 ml ciascuna. Tale separazione ci ha permesso di ottenere un'unica frazione desalificata, di peso pari a 1.6 mg, contenente il ganglioside **2**.

Valutazione dell'attività antiproliferativa dei gangliosidi 1

e 2. Le cellule HuVEC (Promocell GmbH, Heidelberg, Germania) sono state incubate in EGM costituito da EBM supplementato con FCS 2%, VEGF 0.5ng/ml, eparina 22.5µg/ml, EGF 0.1ng/ml, bFGF 1ng/ml, idrocortisone 1µg/ml, anfotericina B 50ng/ml, gentamicina 50µg/ml. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 48 ore ed in tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule tra il 3° ed il 7° passaggio.

Alla fine del tempo di incubazione le cellule sono state fissate e colorate per 20 minuti con 0,1% crystal violet a pH 6,0. Dopo lavaggi con H₂O per allontanare l'eccesso di colorante e solubilizzazione dei monolayer cellulari con 10% acido acetico, le densità ottiche sono state lette con un plate reader (Bio-Rad mod 680) a 595nm.

Al fine di determinare la concentrazione ottimale di VEGF₁₆₅ per indurre una risposta proliferativa, le cellule HuVEC, tenute in EBM con bassa concentrazione di siero (1%) senza altri fattori di crescita per 24 ore, sono state stimulate con diverse concentrazioni di VEGF₁₆₅ (da 0 a 50ng/ml) per 72 ore.

Le HuVEC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 1×10^4 /pozzetto in EGM per 24 ore. Dopo la rimozione del mezzo le cellule sono state tenute per 24 ore in EBM con 1% FBS e, successivamente, sono state incubate in assenza o in presenza di VEGF₁₆₅ a varie concentrazioni per 72 ore.

Il massimo incremento della proliferazione, circa il 40% rispetto al controllo, è stato indotto con 10ng/ml di VEGF₁₆₅, e pertanto tale concentrazione è stata utilizzata in tutti gli esperimenti successivi. Dopo la caratterizzazione del sistema cellulare in relazione alla risposta al mitogeno, si è passati ad analizzare la capacità antiproliferativa dei gangliosidi **1** e **2**; per saggiare l'effetto dei gangliosidi sulla proliferazione cellulare è stato utilizzato il seguente schema sperimentale:

4. Semina in EGM overnight;
5. Trattamento con il ganglioside per 1 ora in EBM con 1% FCS;
6. Incubazione con e senza VEGF₁₆₅ 10ng/ml in EBM con 1% di FCS per 72 ore.

7.3. Gangliosidi 3 e 4 dalla stella *Oreaster reticulatus*

Raccolta, estrazione e procedure di isolamento. Due esemplari della Stella Marina *Oreaster reticulatus*, del peso complessivo di 1.3 kg, prelevati a Grand Bahamas Island (Sweeting Cay) nel Giugno 2003 sono stati congelati subito dopo la raccolta e tenuti in freezer nei laboratori del Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali di Napoli fino al momento dell'analisi.

La stella è stata scongelata e tagliata. Così sminuzzata, è stata sottoposta ad un processo estrattivo che ha previsto tre estrazioni con MeOH 100%, quattro con miscele di MeOH/CHCl₃ (due estrazioni con MeOH/CHCl₃ in rapporto 2:1 una con MeOH/CHCl₃ in rapporto 1:1 e una con MeOH/CHCl₃ in rapporto 1:2) ed infine tre estrazioni con CHCl₃ 100%. Gli estratti metanolici sono stati riuniti e concentrati sottovuoto per dare un estratto che è stato sottoposto a ripartizione tra H₂O e BuOH; dopo quattro lavaggi della fase acquosa, la fase butanolica è stata concentrata sottovuoto ed è stata riunita all'estratto cloroformico per dare un denso olio di colore

arancione scuro dopo evaporazione del solvente. Dell'estratto organico totale, di peso pari a 41.67 g, è stata effettuata una divisione volumetrica: ne sono stati prelevati 21.58 g che sono stati sottoposti a cromatografia su colonna impaccata con gel di silice RP-18. Sono state eluite sette frazioni [eluenti: H₂O/MeOH (9:1); H₂O/MeOH (7:3); H₂O/MeOH (4:6); H₂O/MeOH (2:8); H₂O/MeOH (1:9); MeOH/CHCl₃ (9:1), CHCl₃ 100%]. La frazione eluita con CHCl₃, di peso pari a 3.42 g, è stata sottoposta ad una ripartizione con CHCl₃/MeOH/H₂O nei rapporti, rispettivamente, 8:4:3 (720 ml CHCl₃, 360 ml MeOH, 270 ml H₂O); le due fasi sono state raccolte separatamente, concentrate a pressione ridotta e pesate (peso fase acquosa: 244.1 mg; peso fase organica: 3.3378 g). La fase acquosa è stata sottoposta ad una cromatografia su colonna a scambio ionico. La colonna è stata impaccata, dopo aver rigonfiato e lavato la resina (7.62 g di Sephadex A-25), riempiendola prima per circa 1/3 della sua altezza con il primo eluente (MeOH/CHCl₃/H₂O in rapporto 60:30:8), e poi versando la resina e lasciando impaccare per circa due ore.

Il campione è stato caricato dopo averlo disciolto in 50 ml del primo eluente e lo schema di eluizione procede come già descritto (vedi Capitolo 5). Successivamente, la frazione eluita con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.5\text{M CH}_3\text{COONa}$ in H_2O , di peso pari a 538 mg ed ottenuta sulla base di analisi di tipo TLC, è stata sottoposta ad una cromatografia su colonna ad esclusione molecolare per rimuovere il sale. La colonna è stata impaccata con resina Sephadex LH-20 precedentemente messa a rigonfiare per una notte con MeOH 100%. In seguito il campione, disciolto in metanolo, è stato caricato, eluito sempre con MeOH 100% e sono state raccolte 20 frazioni di 10 ml ciascuna. Tale separazione ci ha permesso di ottenere due frazioni desalificate, di peso pari a 3.5 mg e 3.1 mg, contenente due gangliosidi non puri, che sono state riunite. La frazione così ottenuta è stata sottoposta a una reazione di peracetilazione per 12h a temperatura ambiente con Ac_2O in piridina. Il campione è stato quindi trattato con MeOH 100% per far reagire l'anidride acetica in eccesso e successivamente portato a secco sottovuoto e pesato (11.8 mg). Tale frazione è stata cromatografata tramite HPLC a fase diretta (colonna Luna 3 μ Silica) utilizzando come miscela

eluente *n*-esano/AcOEt (4:6), ad un flusso di 0.6 ml/min. Da tale separazione si sono ottenuti i gangliosidi peracetilati **5** (1.2 mg) e **8** (2.7 mg), ed i due derivati peracetilati **7** (0.9 mg) e **9** (0.6 mg).

Apertura dell'anello lattonico del composto 5. 0.5 mg del composto **5** sono stati solubilizzati in 1.8 ml di metanolo + 10 µl di piridina, e la soluzione ottenuta è stata tenuta a temperatura ambiente per 12 ore. La miscela di reazione è stata poi portata a secco sotto azoto.

Deacetilazione (metanolisi basica). Un'aliquota del composto **5** (0.5 mg) è stata deacetilata con 2ml di una miscela MeOH/H₂O (9:1) e 2 gocce di MeONa 0.4 M a temperatura ambiente per 12h. La miscela di reazione è stata concentrata sottovuoto e sottoposta a ripartizione tra H₂O/BuOH. La fase butanolica contiene 0.4 mg del composto deacetilato **3**. La stessa procedura è stata utilizzata per 0.5 mg del composto **8**, ed ha condotto a 0.4 mg del composto **4**.

Metanolisi acida. 200 µg del composto **3** sono stati solubilizzati in 1 ml di HCl 1N in 91% di MeOH e la soluzione ottenuta è stata posta in un palloncino sigillato per circa 12 h a 80 °C. La miscela di reazione è stata poi portata a secco sotto azoto, il residuo è stato solubilizzato con 10 µl di piridina e stato ripartito tra CHCl₃ e H₂O/MeOH (8:2). Dopo separazione delle due fasi e rimozione del solvente, effettuata sotto azoto, la fase acquosa conteneva una miscela di metil glicosidi, frazione A, e la fase organica una miscela di esteri metilici degli α-idrossiacidi e di sfinganine, frazione B. Alla stessa reazione sono stati sottoposti 200 µg del composto **4**.

Configurazione assoluta dei metil glicosidi. La frazione A della metanolisi del composto **3** è stata benzoilata con cloruro di benzoile (20µl) in piridina (500 µl) a 25°C per 16 h. La miscela di reazione è stata direttamente portata a secco sotto azoto. Il metil benzoato è stato rimosso tenendo il residuo sotto vuoto ad una pompa ad olio olio per 48 ore. Il residuo è stato purificato tramite HPLC (colonna: Luna SiO₂, 5µ; eluente: *n*-esano/*iso*PrOH 99:1, flusso: 1 ml/min). Il cromatogramma conteneva due picchi, i quali sono stati identificati per confronto

dei loro tempi di ritenzione e dei loro spettri ^1H NMR e CD con quelli di campioni autentici preparati con lo stesso procedimento a partire da D-galattosio e acido D -sialico. Lo stesso procedimento è stato seguito per l'analisi dei metilglicosidi ottenuti dalla metanolisi acida del composto **4**.

Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi. Le frazioni B provenienti dalle metanolisi dei composti **3** e **4** sono state analizzate attraverso GC-MS, ed i loro componenti identificati per confronto dei loro tempi di ritenzione e spettri di massa con quelli di campioni autentici.

Analisi della frazione B. La frazione B della metanolisi del composto **3** è stata benzoilata come descritto in precedenza, e il prodotto di reazione è stato purificato su HPLC (colonna: Luna SiO_2 , 5 μ ; eluente: *n*-esano/*i*-PrOH 99:1, flusso 1 ml/min). Il cromatogramma conteneva due picchi che sono stati identificati come una miscela di omologhi di esteri metilici dei (*R*)-2-benzoilossi-acidi (frazione C, $t_R = 3.8$ min) e una miscela di D-*ribo*-fitosfingosine (frazione D, $t_R = 6.5$ min) attraverso il

confronto dei loro rispettivi spettri ^1H NMR e CD con quelli riportati. La stessa procedura è stata seguita per la frazione B della metanolisi del composto **4**.

Analisi delle sfinganine. Le frazioni D provenienti dai composti **3** e **4** sono state debenzoilate attraverso una metanolisi acida come sopra riportato, e sottoposte a scissione ossidativa con $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$. Gli acidi carbossilici risultanti sono stati metilati con CH_2N_2 ; gli esteri così ottenuti sono stati analizzati attraverso GC-MS, ed identificati per confronto dei loro tempi di ritenzione e spettri di massa con quelli di campioni autentici.

7.4. Oreacerebrosidi dalla stella *Oreaster reticulatus*

Raccolta, estrazione e procedure di isolamento. Due esemplari della Stella Marina *Oreaster reticulatus*, del peso complessivo di 1.3 kg, prelevati a Grand Bahamas Island (Sweeting Cay) nel Giugno 2003 sono stati congelati subito dopo la raccolta e tenuti in freezer nei laboratori del Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali di Napoli fino al momento dell'analisi.

La stella è stata scongelata e tagliata. Così sminuzzata, è stata sottoposta ad un processo estrattivo che ha previsto tre estrazioni con MeOH 100%, quattro con miscele di MeOH/CHCl₃ (due estrazioni con MeOH/CHCl₃ in rapporto 2:1 una con MeOH/CHCl₃ in rapporto 1:1 e una con MeOH/CHCl₃ in rapporto 1:2) ed infine tre estrazioni con CHCl₃ 100%. Gli estratti metanolici sono stati riuniti e concentrati sottovuoto per dare un estratto che è stato sottoposto a ripartizione tra H₂O e BuOH; dopo quattro lavaggi della fase acquosa, la fase butanolica è stata concentrata sottovuoto ed è stata riunita all'estratto cloroformico per dare un denso olio di colore

arancione scuro dopo evaporazione del solvente. Dell'estratto organico totale, di peso pari a 41.67 g, è stata effettuata una divisione volumetrica: ne sono stati prelevati 21.58 g che sono stati sottoposti a cromatografia su colonna impaccata con gel di silice RP-18. Sono state eluite sette frazioni [eluenti: H₂O/MeOH (9:1); H₂O/MeOH (7:3); H₂O/MeOH (4:6); H₂O/MeOH (2:8); H₂O/MeOH (1:9); MeOH/CHCl₃ (9:1), CHCl₃ 100%]. La frazione eluita con CHCl₃, di peso pari a 3.42 g, è stata sottoposta ad una ripartizione con CHCl₃/MeOH/H₂O nei rapporti, rispettivamente, 8:4:3 (720 ml CHCl₃, 360 ml MeOH, 270 ml H₂O); le due fasi sono state raccolte separatamente, concentrate a pressione ridotta e pesate (peso fase acquosa: 244.1 mg; peso fase organica: 3.3378 g). la fase cloroformica è stata ulteriormente sottoposta a cromatografia su colonna di SiO₂ [eluenti: *n*-esano/AcOEt (9:1); *n*-esano/AcOEt (8:2); *n*-esano/AcOEt (6:4); *n*-esano/AcOEt (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), MeOH 100%], dando una frazione [121 mg, eluente AcOEt/ MeOH (7:3)] composta principalmente da glicolipidi. La maggior parte di questa frazione di glicolipidi (100 mg) è stata peracetilata con Ac₂O in piridina per 12 h e

separata attraverso HPLC a fase diretta (colonna Luna 10 μ Silica) utilizzando come miscela eluente *n*-esano/AcOEt (7:3), ad un flusso di 5 ml/min. La frazione eluita con un tempo di ritenzione pari a 30 minuti, di peso pari a 25,2 mg, è stata ulteriormente cromatografata tramite HPLC a fase diretta (colonna Luna 5 μ Silica) utilizzando come eluente una miscela *n*-esano/isopropanolo (95:5), ad un flusso di 1 ml/min; con un tempo di ritenzione di 20 minuti è stata eluita una miscela di peso pari a 13.1mg.

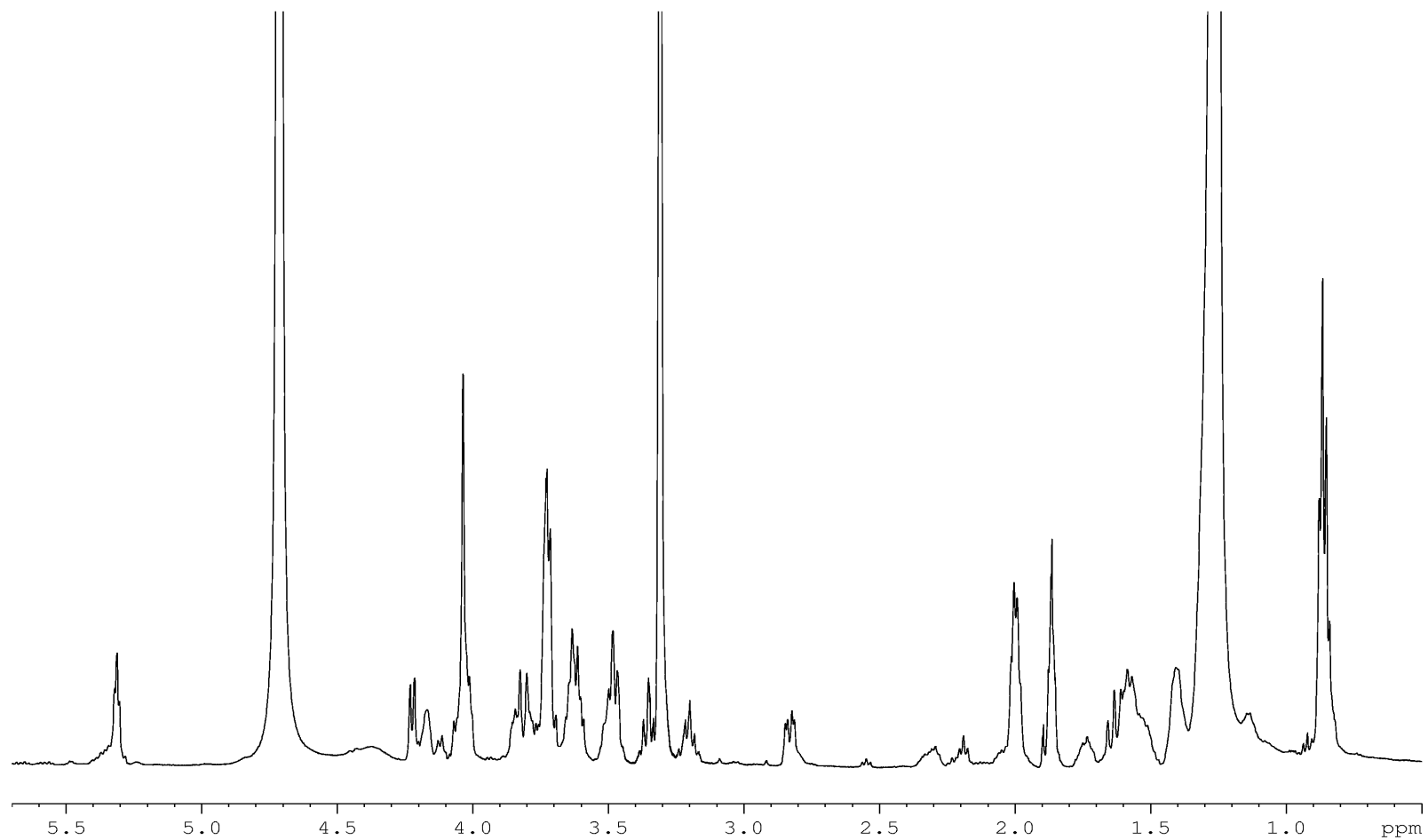
Tale frazione è stata deacetilata con 2ml di MeOH e 2 gocce di MeONa 0.4M a temperatura ambiente per 12h. La miscela di reazione è stata concentrata sottovuoto e sottoposta a ripartizione tra H₂O/CHCl₃. La fase cloroformica, di peso pari a 11,7 mg, è stata cromatografata tramite HPLC a fase diretta utilizzando una colonna Luna 5 μ Silica e una miscela eluente *n*-esano/isopropanolo (7:3), ad un flusso di 1 ml/min, ottenendo la Frazione A, di peso pari a 3.9 mg, e la Frazione B, di peso pari a 3.5 mg. La Frazione A è stata sottoposta ad una successiva cromatografia per HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna Luna 5 μ C-18 e come eluente MeOH 100% ad un flusso di 1

ml/min: sono stati ottenuti 0.4 mg del composto **10a**, 0.6 mg della miscela dei composti **10b+10c**, 1.0 mg della miscela dei composti **10d+10e**, e 0.7 mg del composto **10f**. Anche la Frazione B è stata sottoposta ad una successiva cromatografia per HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna Luna 5 μ C-18 e come eluente MeOH 100% ad un flusso di 1 ml/min: si sono ottenuti 1.4 mg del composto **11a**, 1.3 mg della miscela dei composti **11b+11c**, 0.6 mg della miscela dei composti **11d+11e**, e 0.6 mg del composto **11f**.

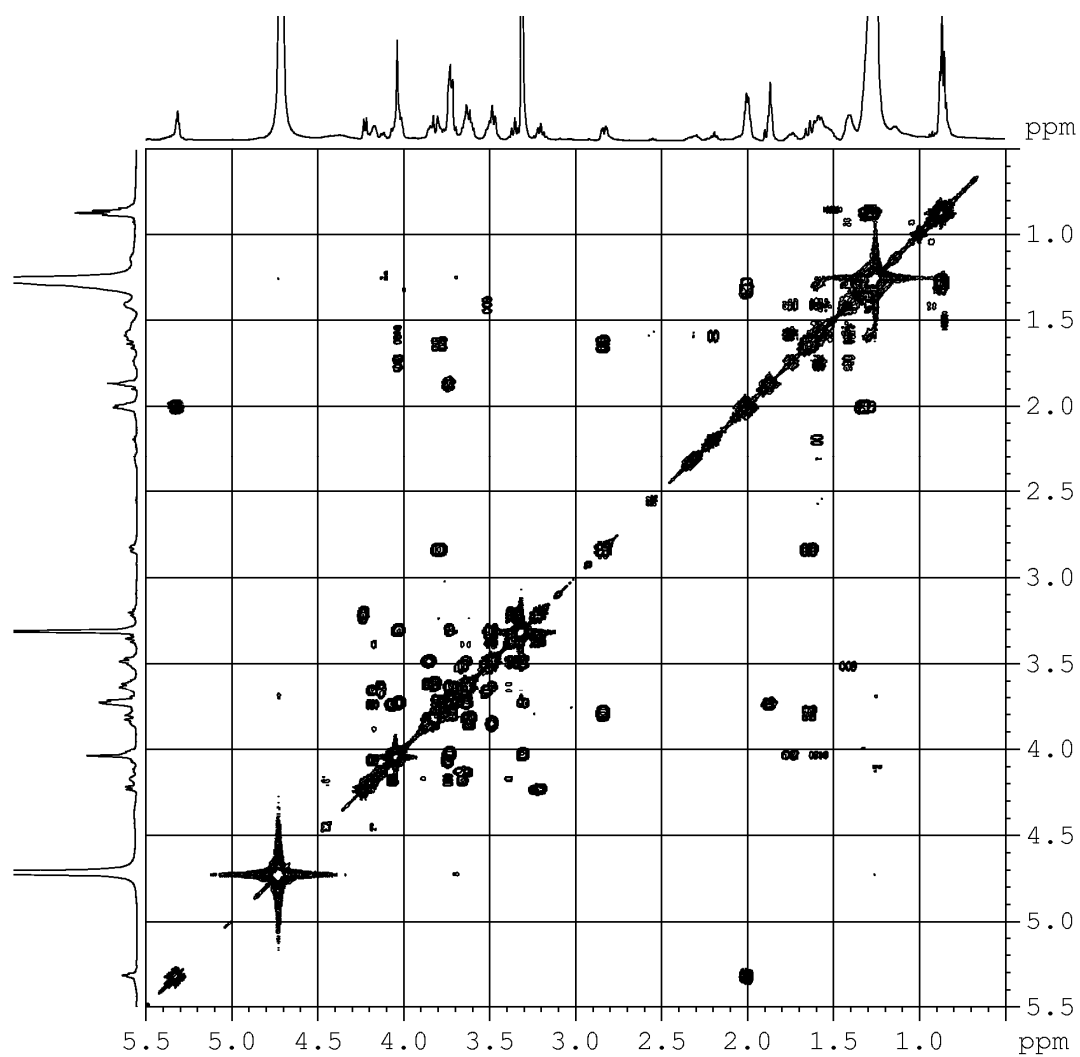
Metanolisi acida della Frazione B. 100 μ g della Frazione B sono stati solubilizzati in 1 ml di una soluzione 1M di HCl in MeOH al 91%, e la soluzione ottenuta è stata posta in un palloncino sigillato per circa 12 h a 80 °C. La miscela di reazione è stata poi portata a secco sotto azoto, il residuo è stato solubilizzato con 10 μ l di piridina e stato ripartito tra CHCl₃ e H₂O/MeOH (8:2). Dopo separazione delle due fasi e rimozione del solvente, effettuata sotto azoto, la fase acquosa conteneva una miscela di metil glicosidi, frazione A, e la fase organica una

miscela di esteri metilici degli α - idrossiacidi e di sfinganine, frazione B.

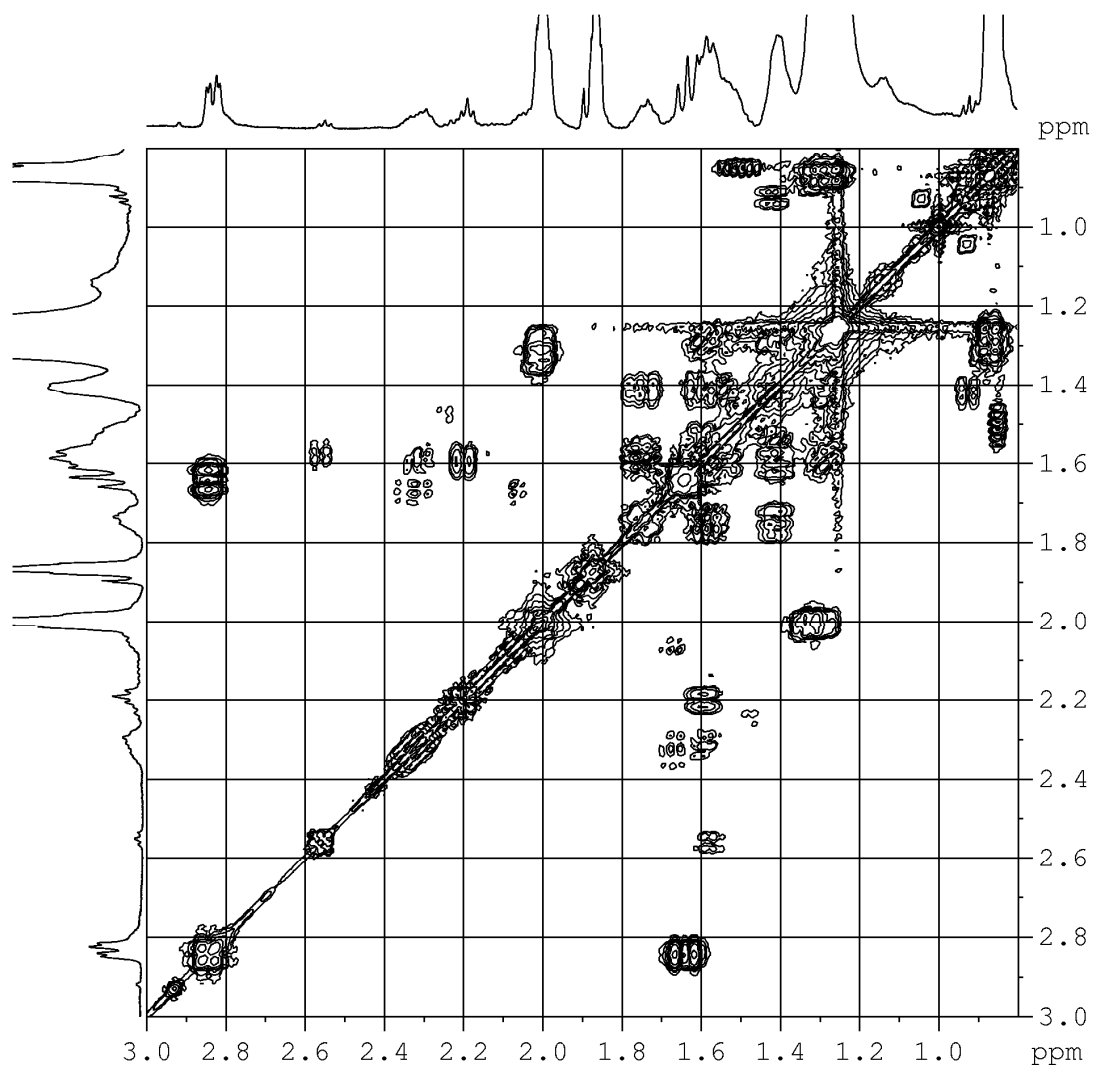
Configurazione assoluta dei metil glicosidi. La frazione contenente i metilglicosidi è stata benzoilata con cloruro di benzoile (20 μ l) in piridina (500 μ l) a 25°C per 16 h. La miscela di reazione è stata direttamente portata a secco sotto azoto. Il metil benzoato è stato rimosso tenendo il residuo sotto vuoto ad una pompa ad olio olio per 48 ore. Il residuo è stato purificato tramite HPLC (colonna: Luna SiO₂, 5 μ ; eluente: *n*-esano/*iso*PrOH 99:1, flusso: 1 ml/min). Il cromatogramma conteneva un picco che è stato identificato come metil 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-galattopiranoside sulla base del confronto del tempo di ritenzione e dello spettro CD di tale composto con quelli di un campione autentico ottenuto, con lo stesso procedimento, a partire da D-galattosio.



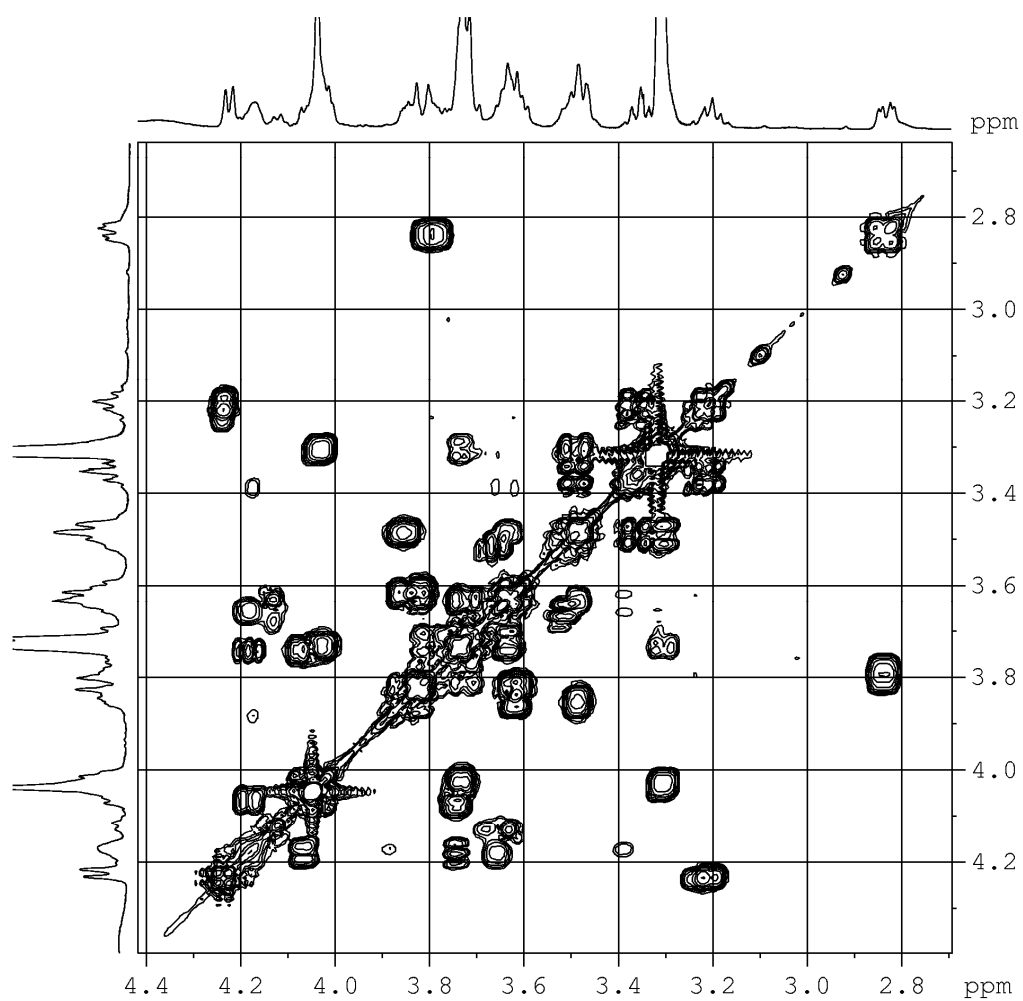
Spettro ^1H NMR del composto **1** in $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ a 500 MHz



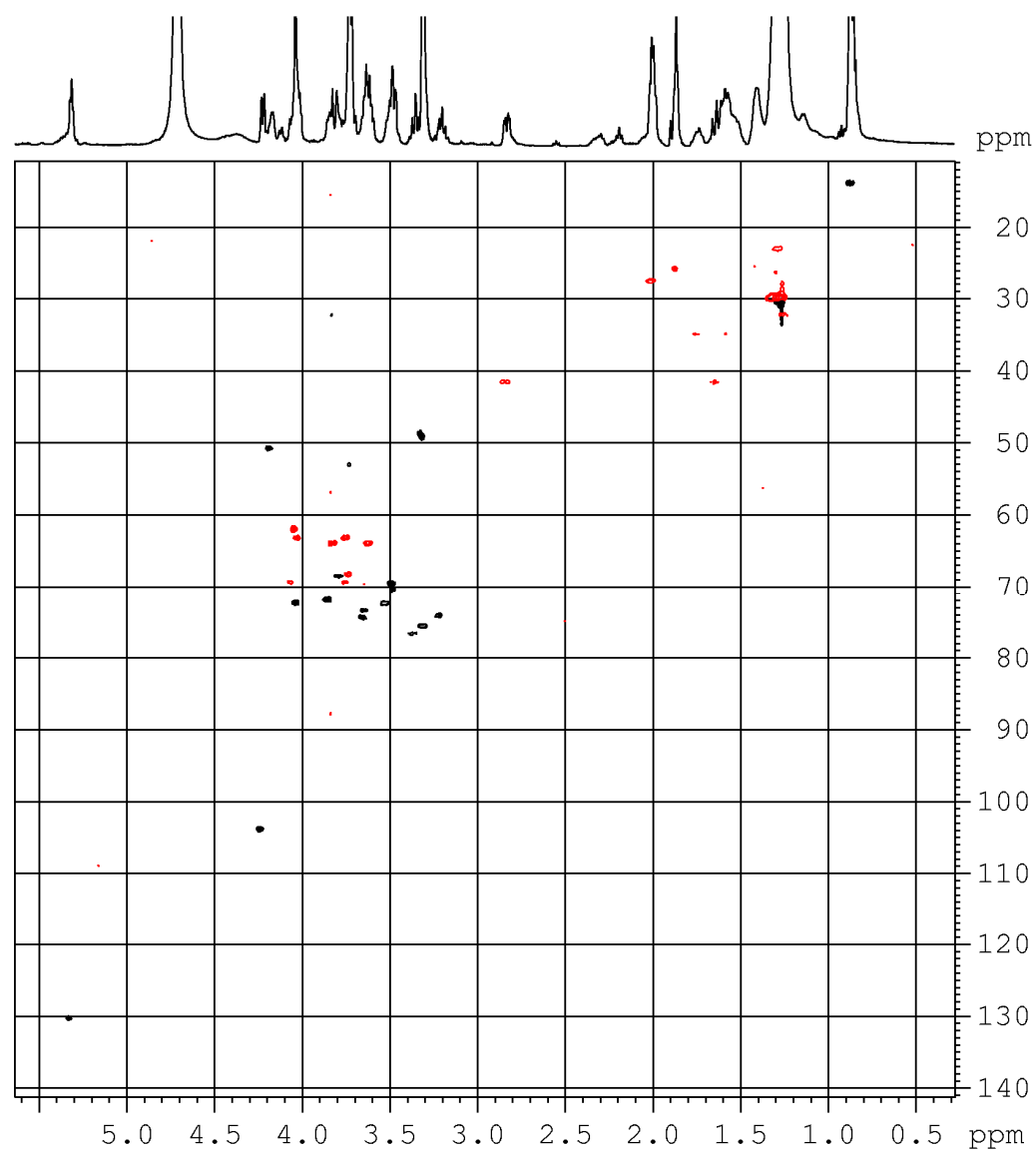
Spettro COSY del composto **1** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



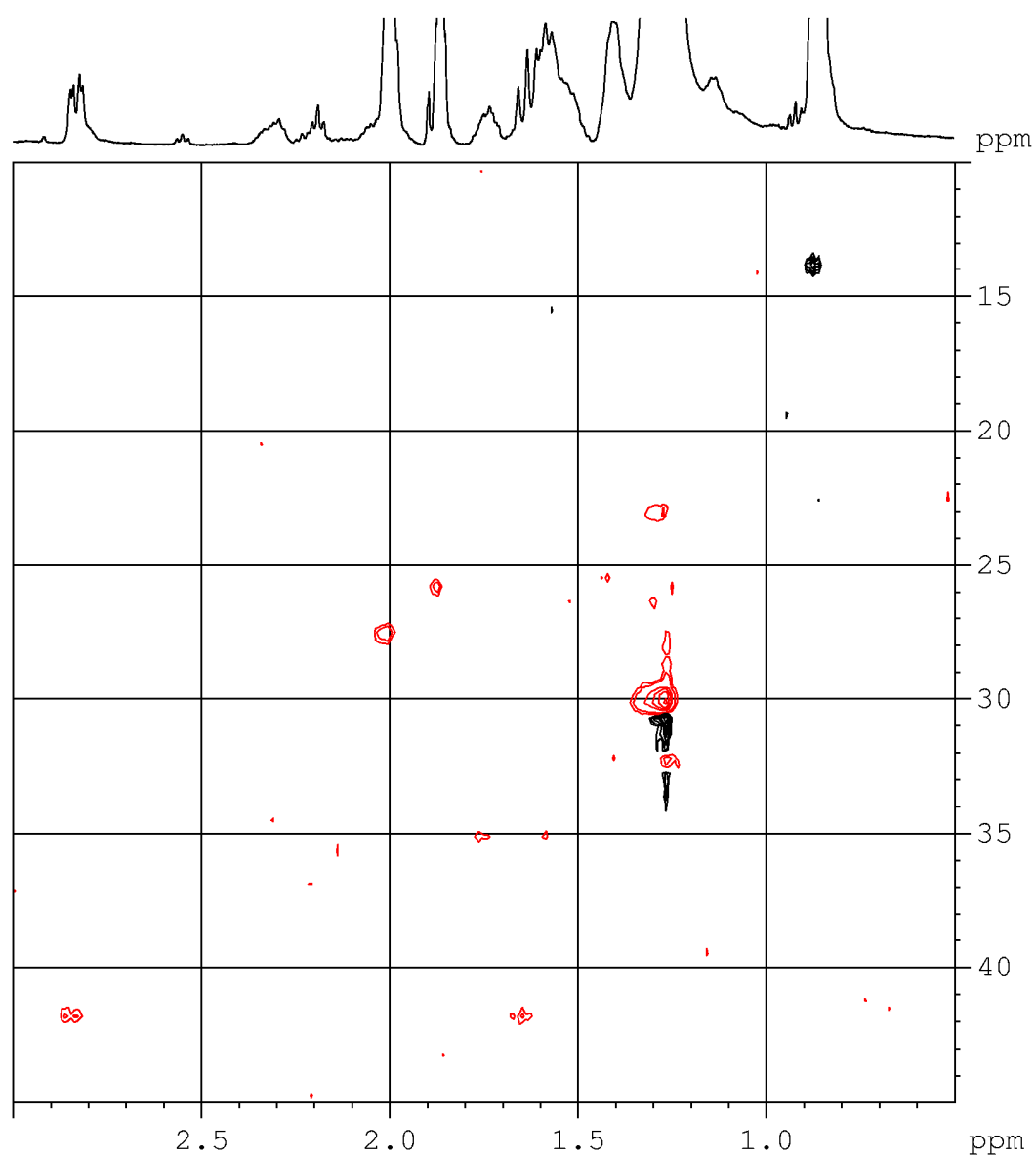
Regione a campi alti dello spettro COSY
del composto **1** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



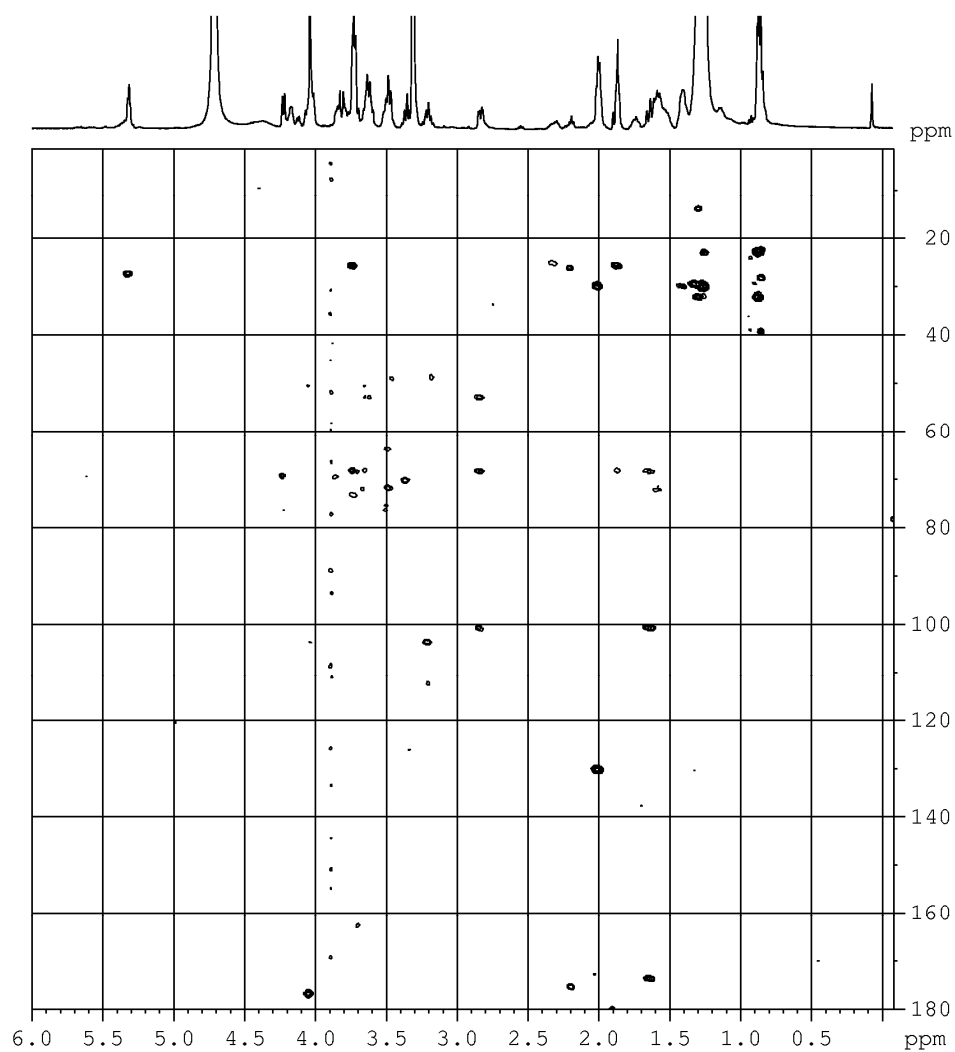
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **1** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



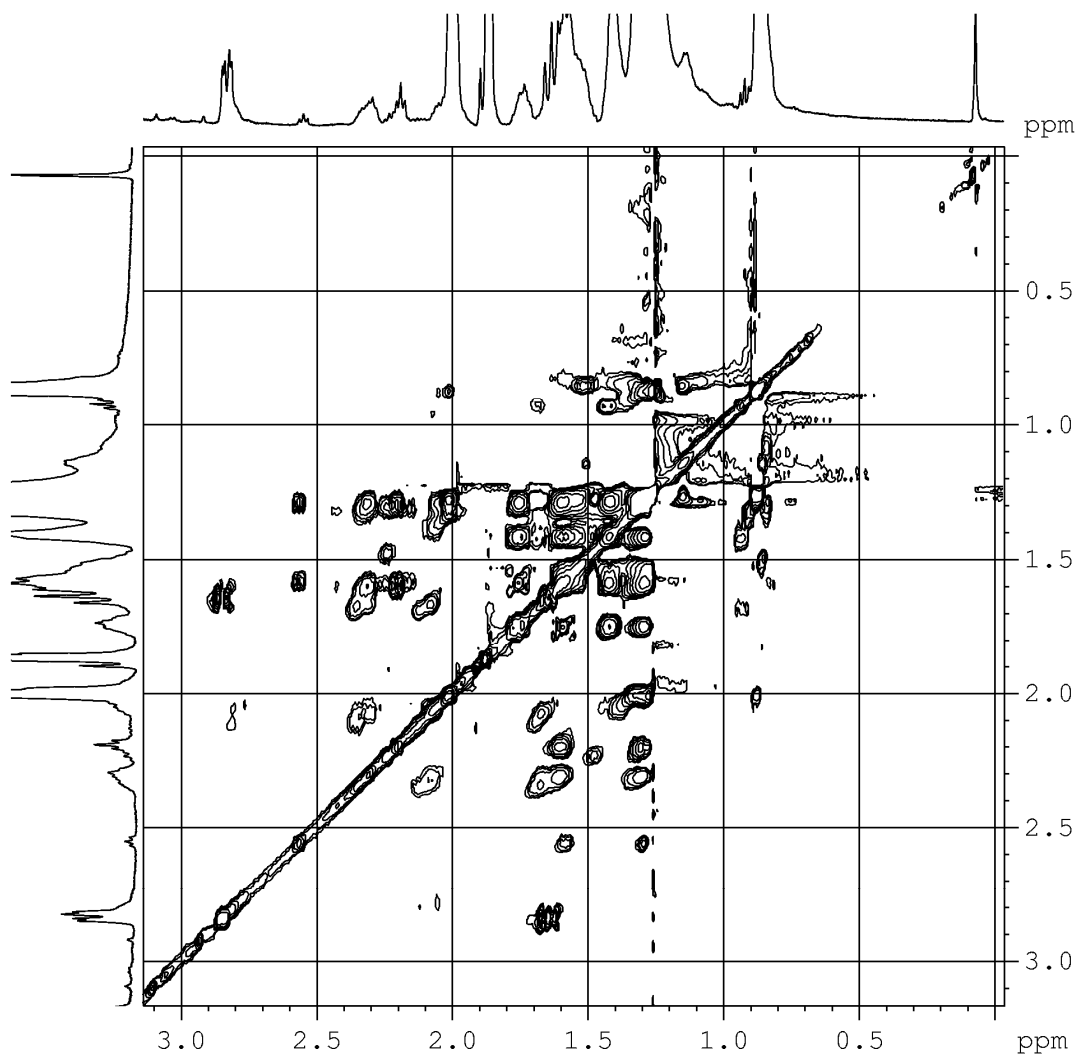
Spettro HSQC del composto **1** in MeOD/ CDCl_3 a 500 MHz



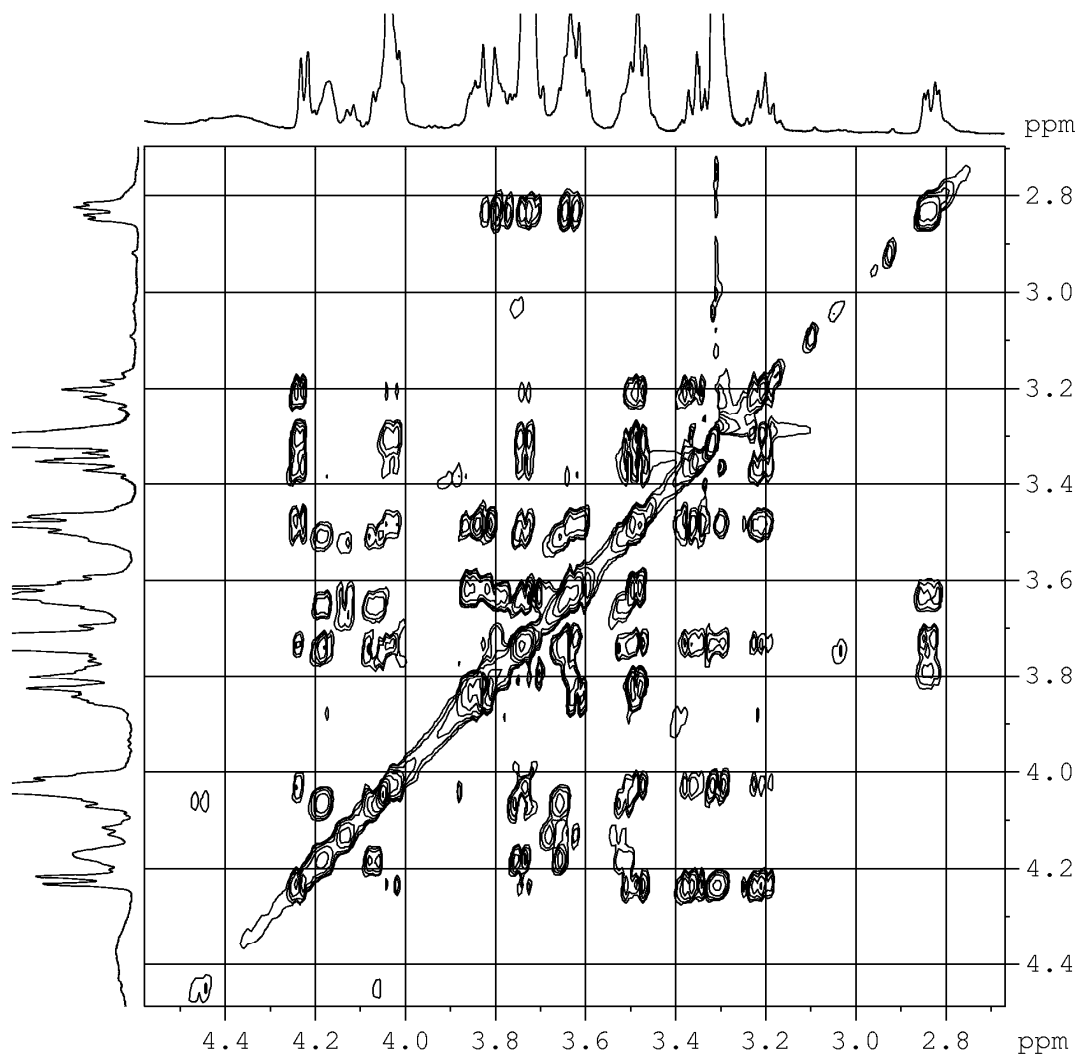
Regione a campi alti dello spettro HSQC
del composto **1** in MeOD/ CDCl_3 a 500 MHz



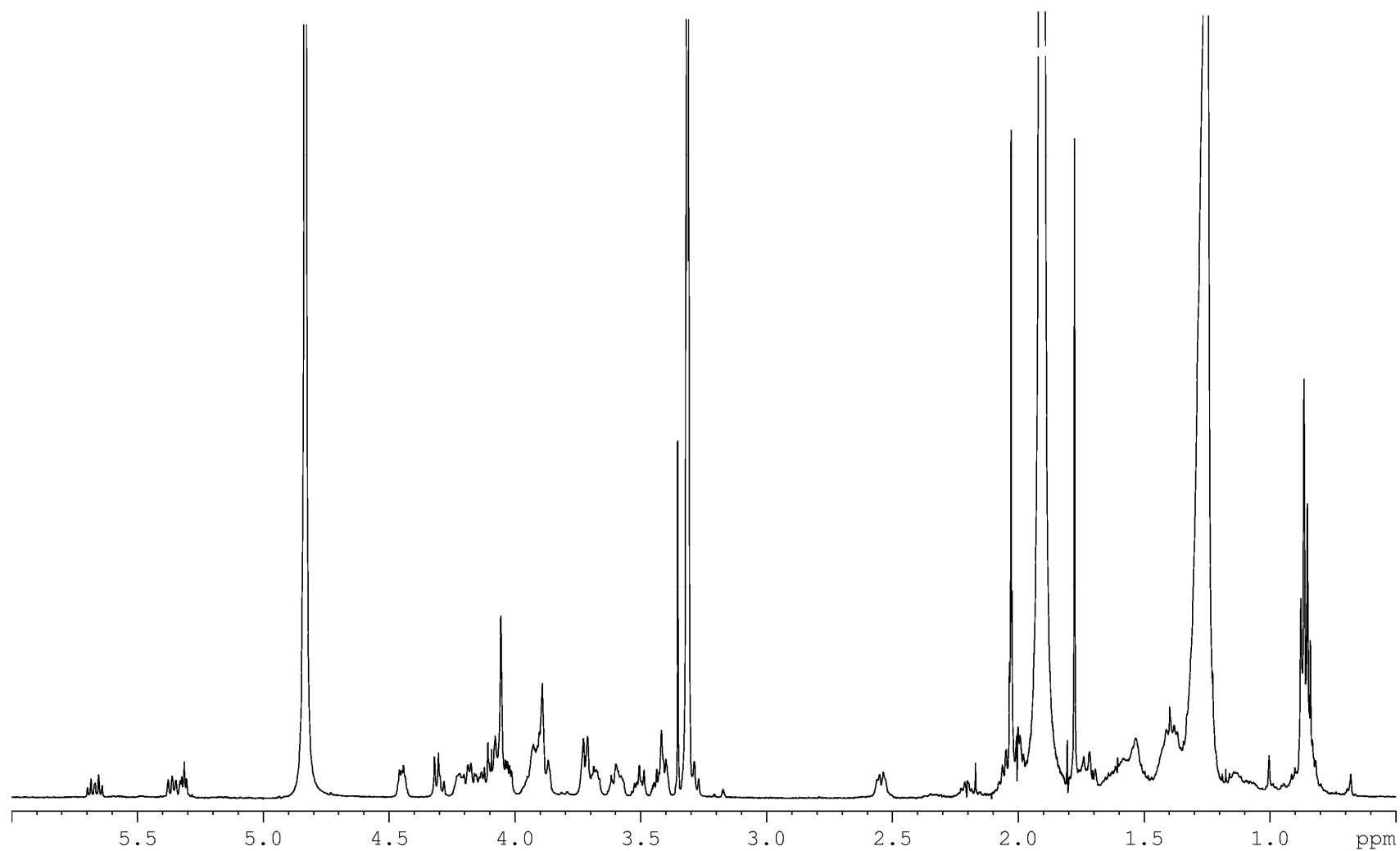
Spettro HMBC del composto **1** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



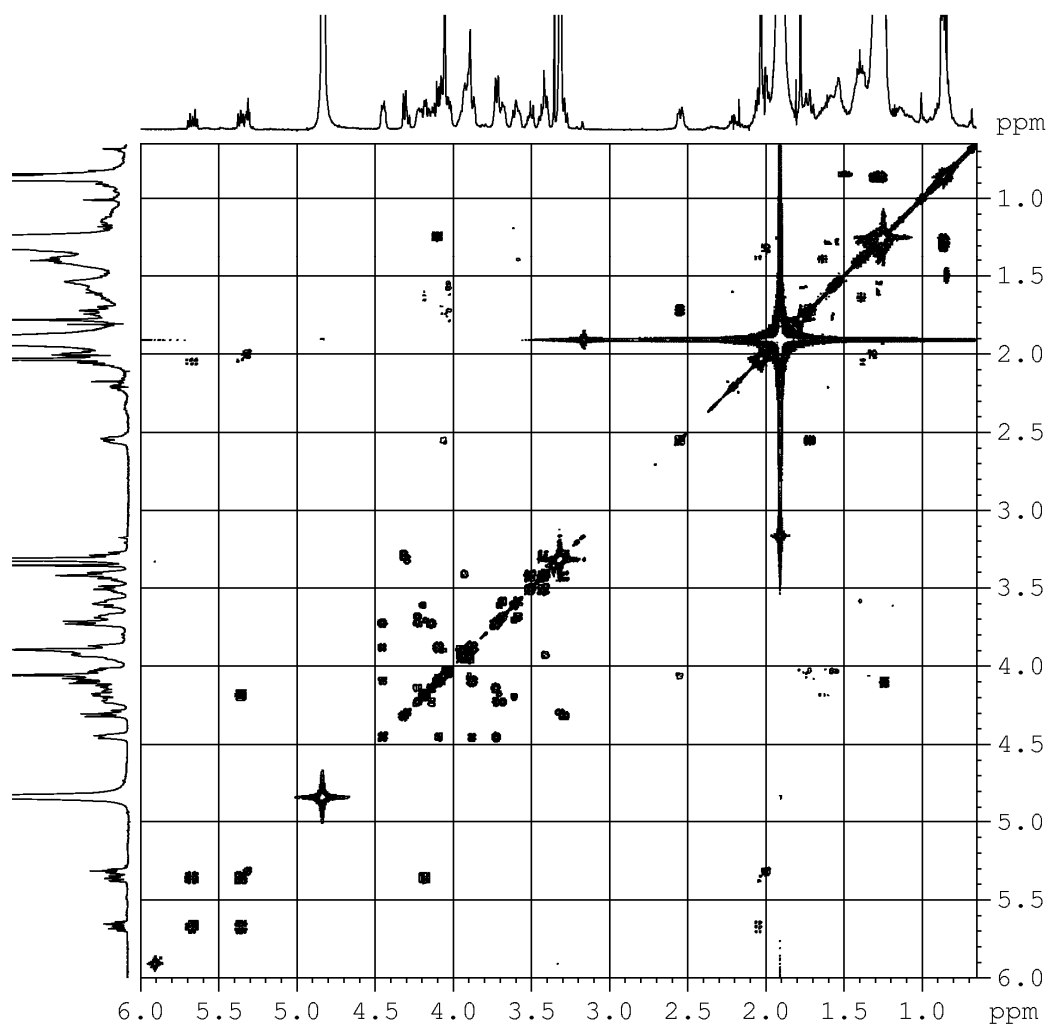
Regione a campi alti dello spettro TOCSY
del composto **1** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



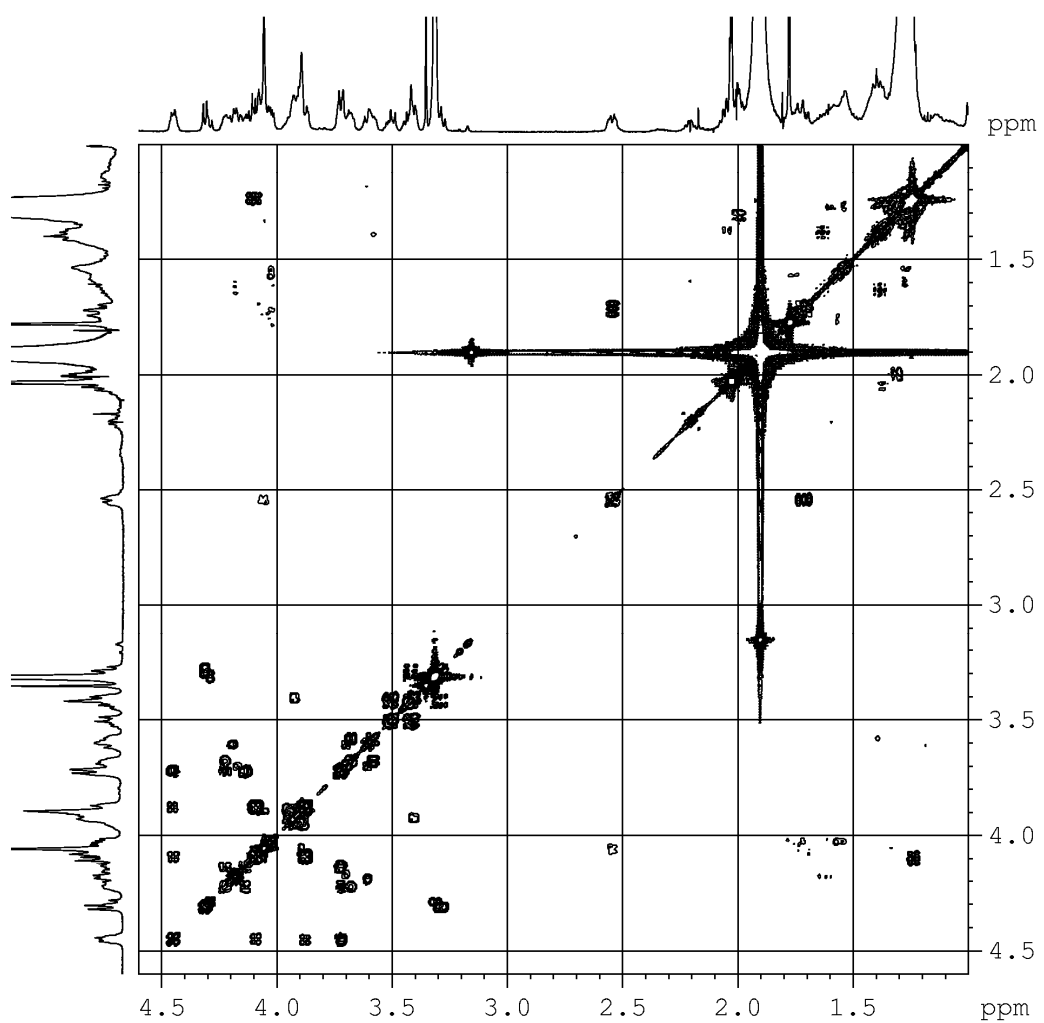
Regione a campi medi dello spettro TOCSY
del composto **1** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



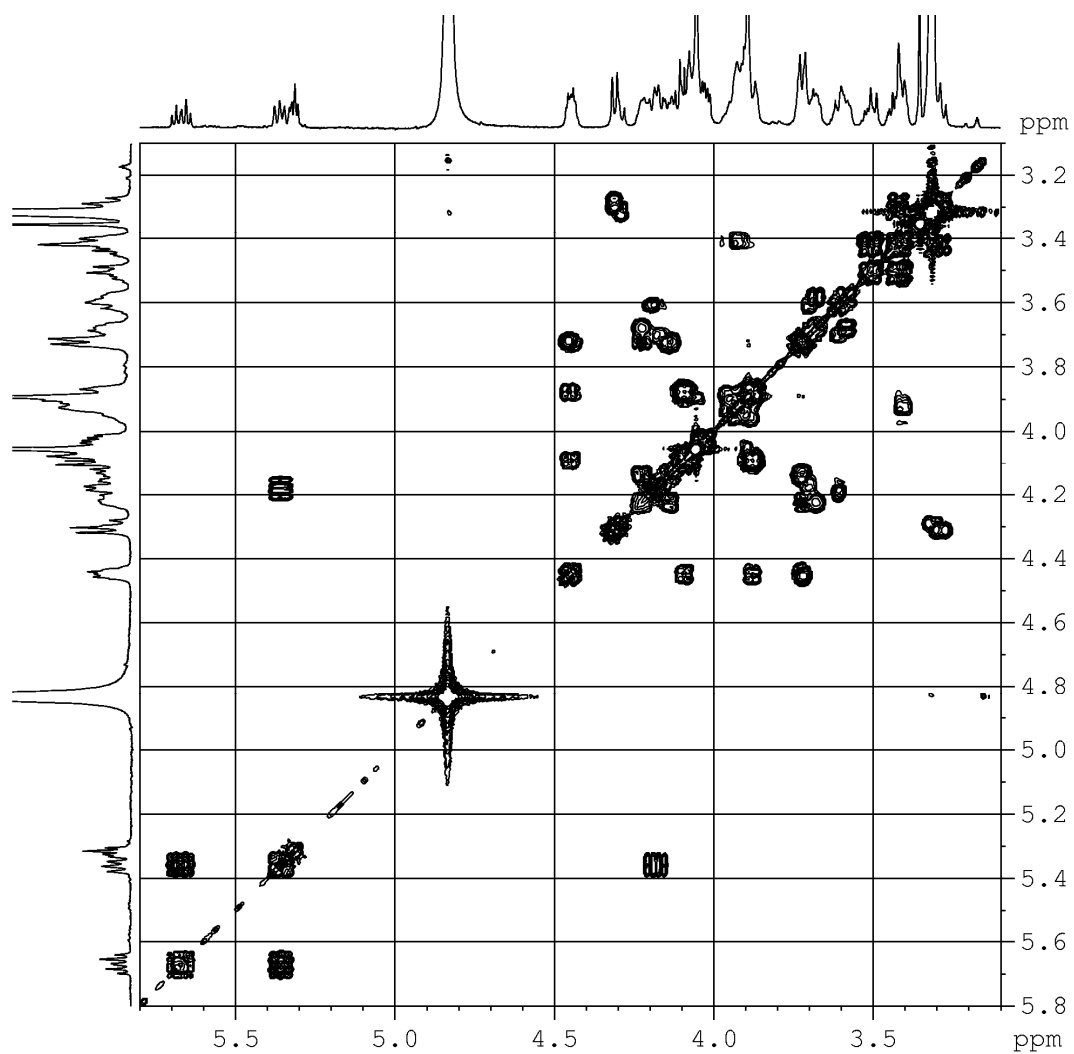
Spettro ^1H NMR del composto **2** in $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ a 500 MHz



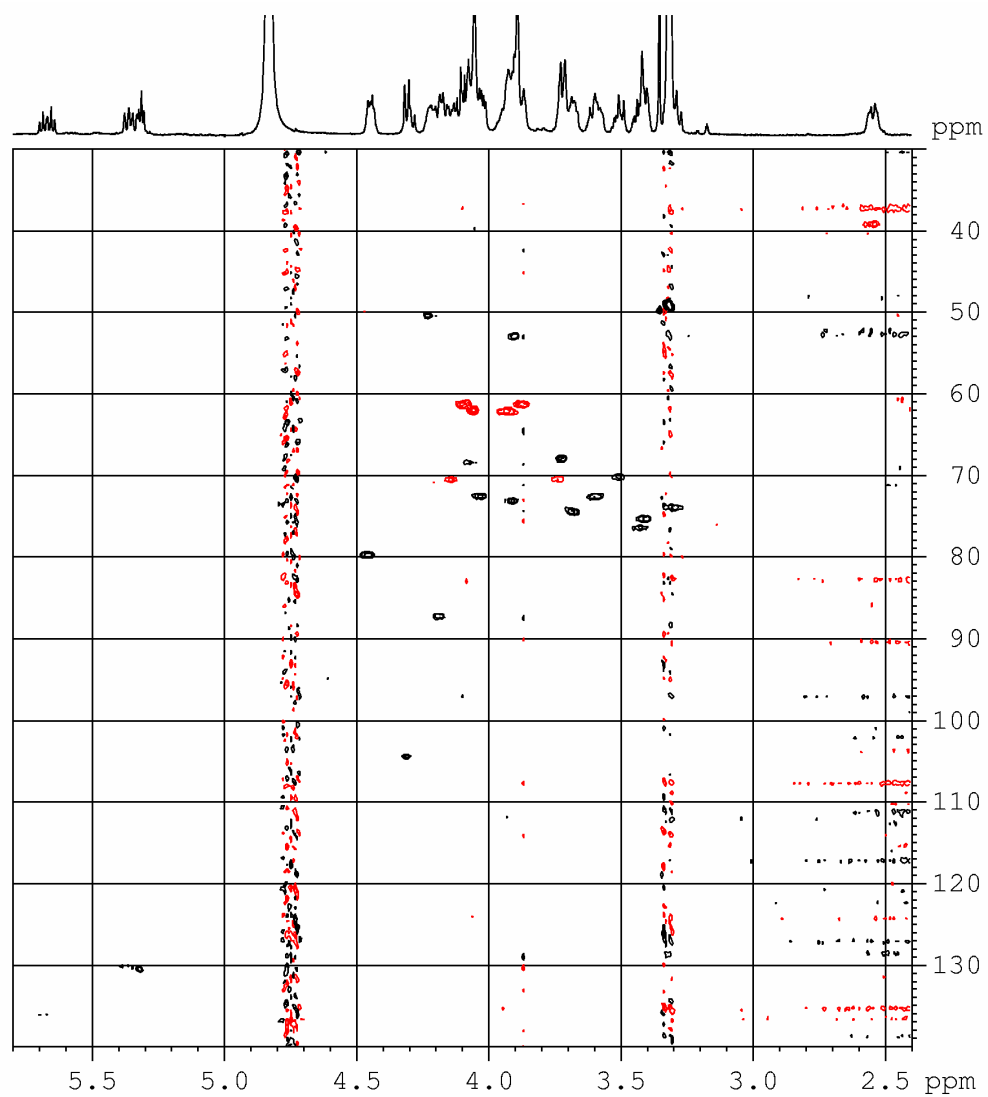
Spettro COSY del composto **2** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



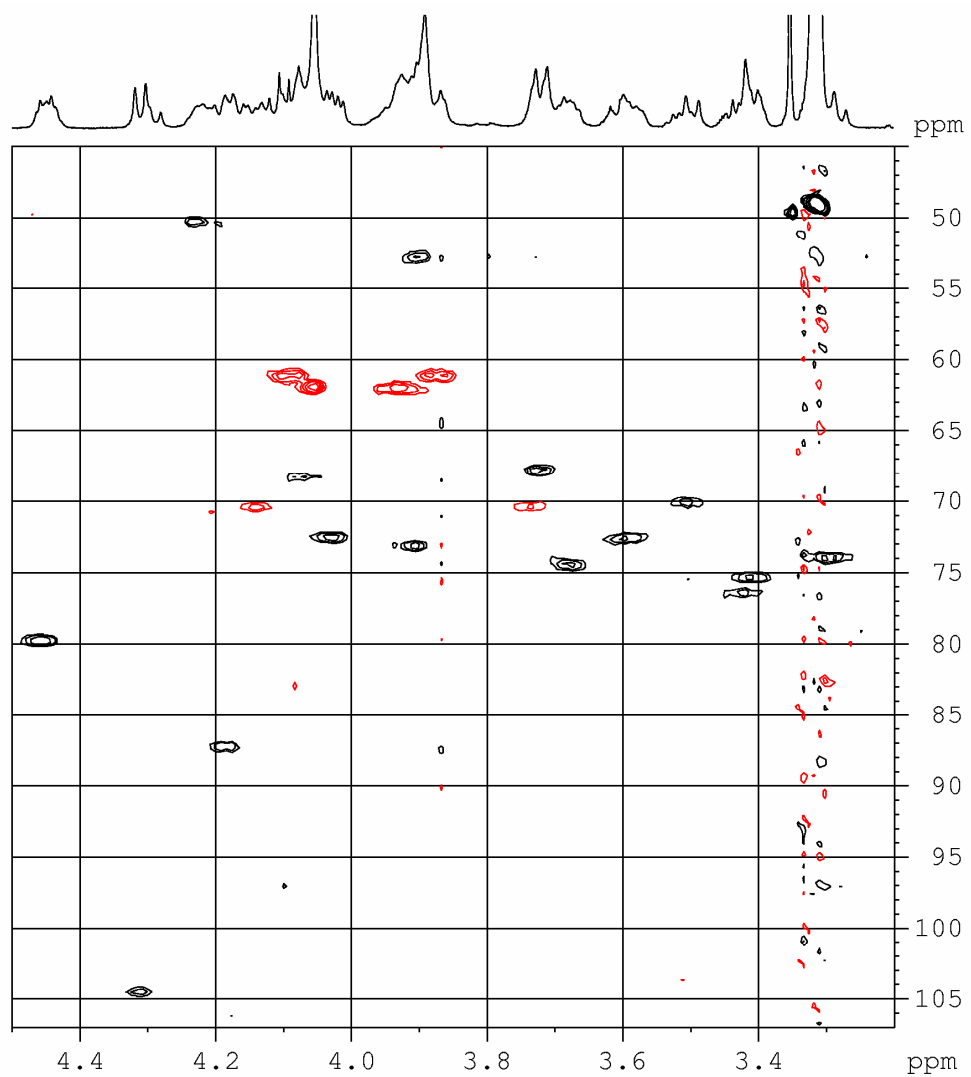
Regione a campi alti dello spettro COSY
del composto **2** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



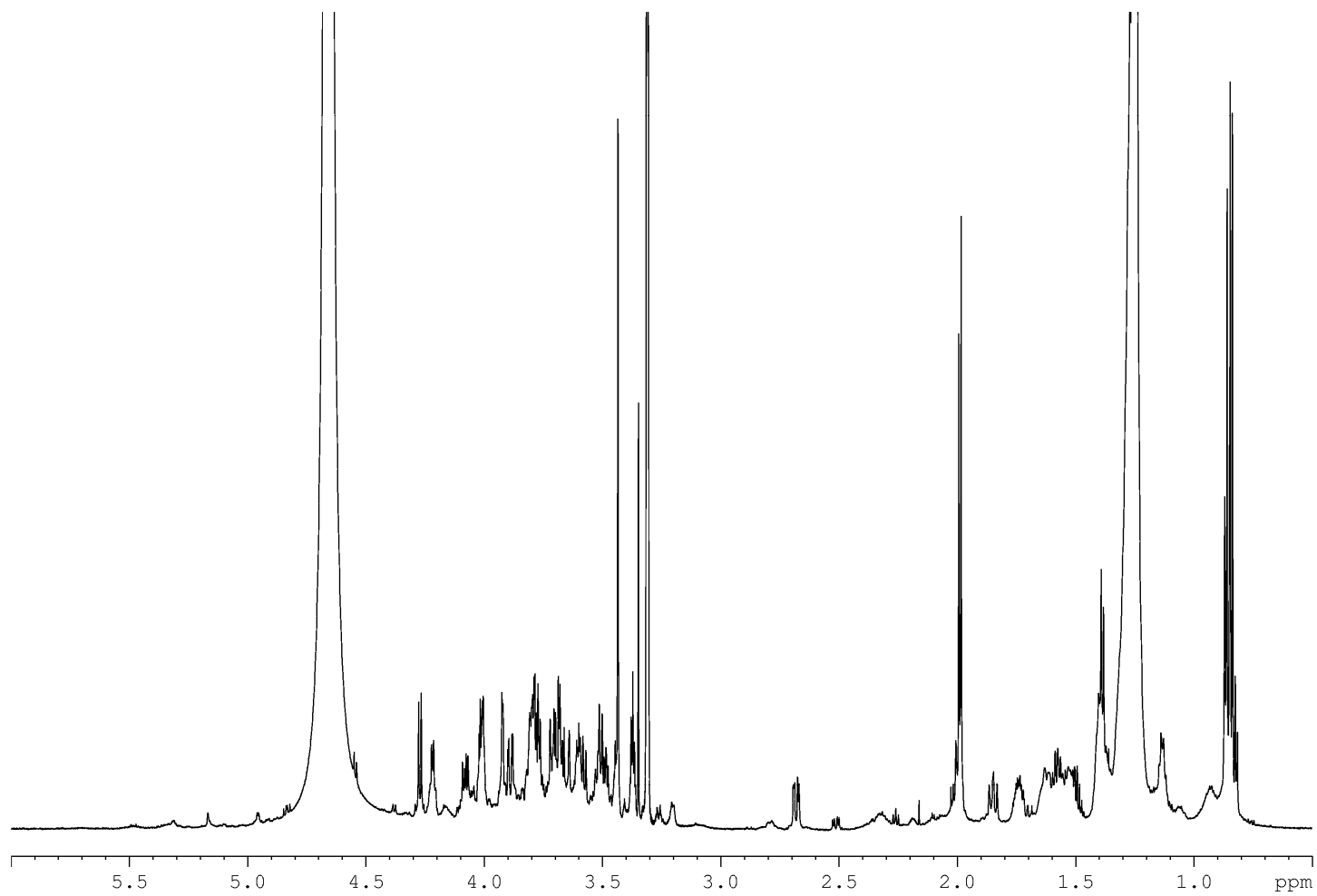
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **2** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



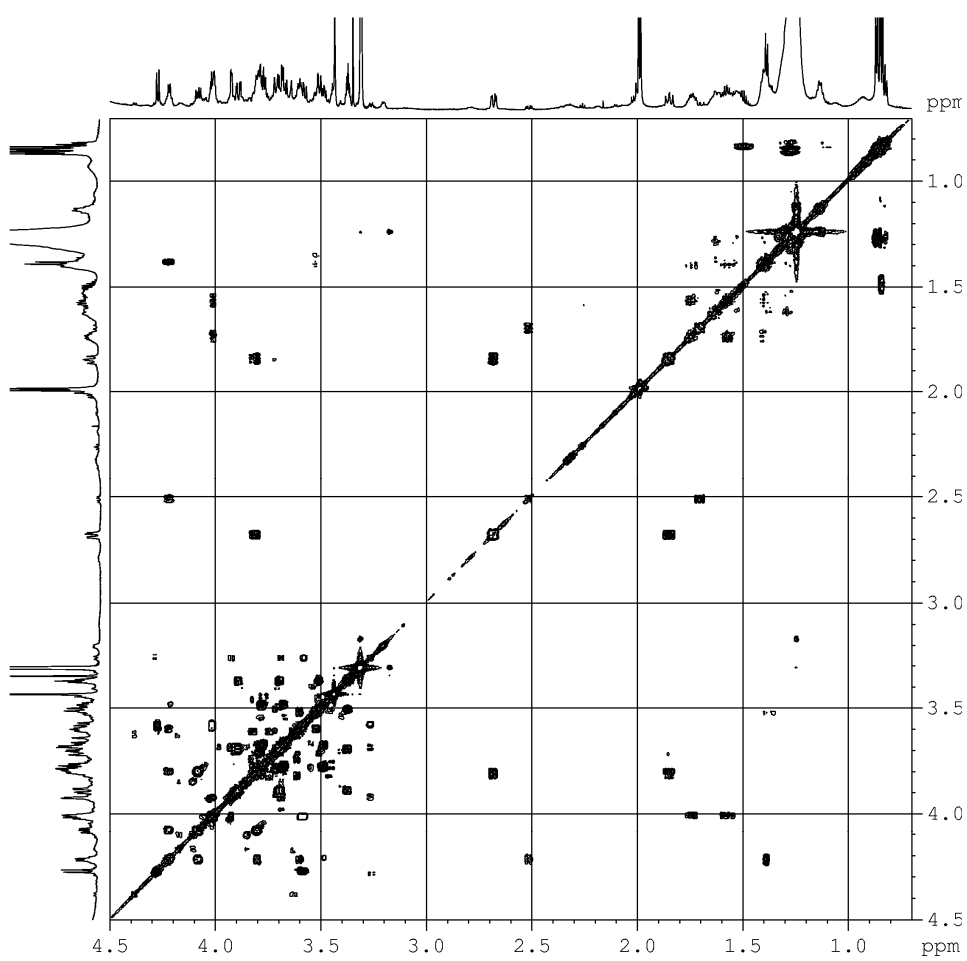
Regione a campi medi dello spettro HSQC
del composto **2** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



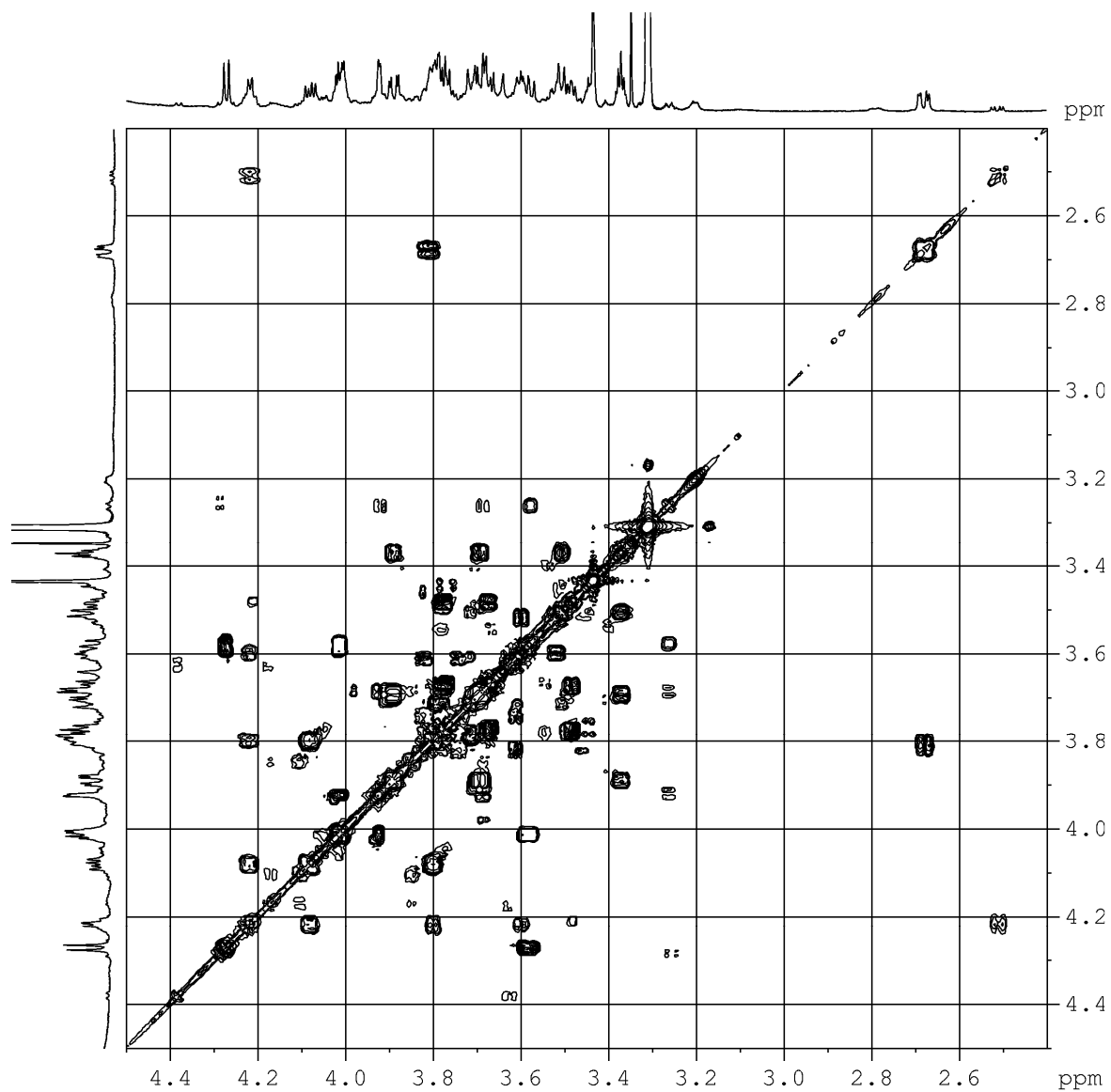
Regione a campi medi dello spettro HSQC
del composto **2** in MeOD/CDCl₃ a 500 MHz



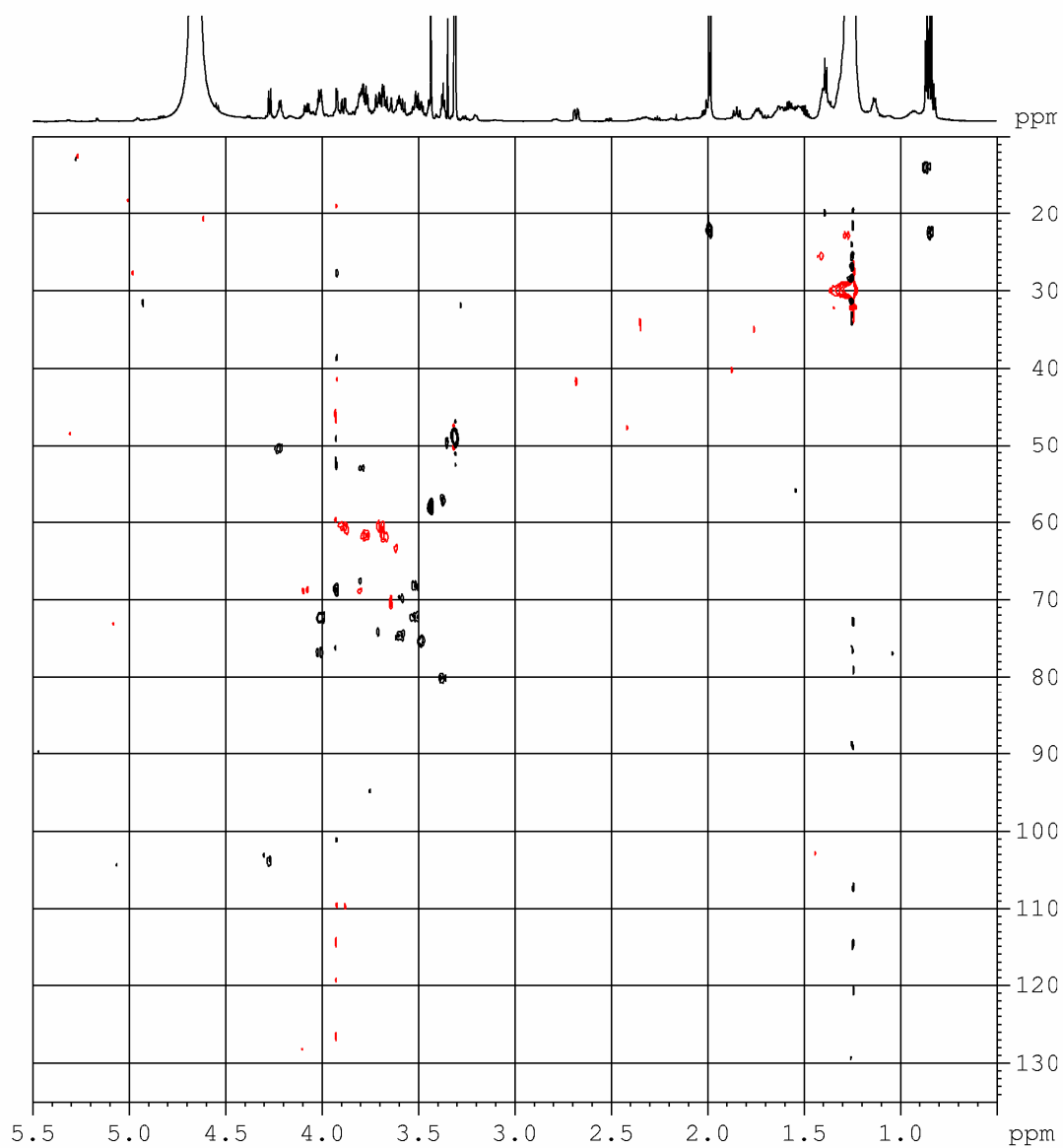
Spettro ^1H -NMR del composto **3** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ a 700 MHz



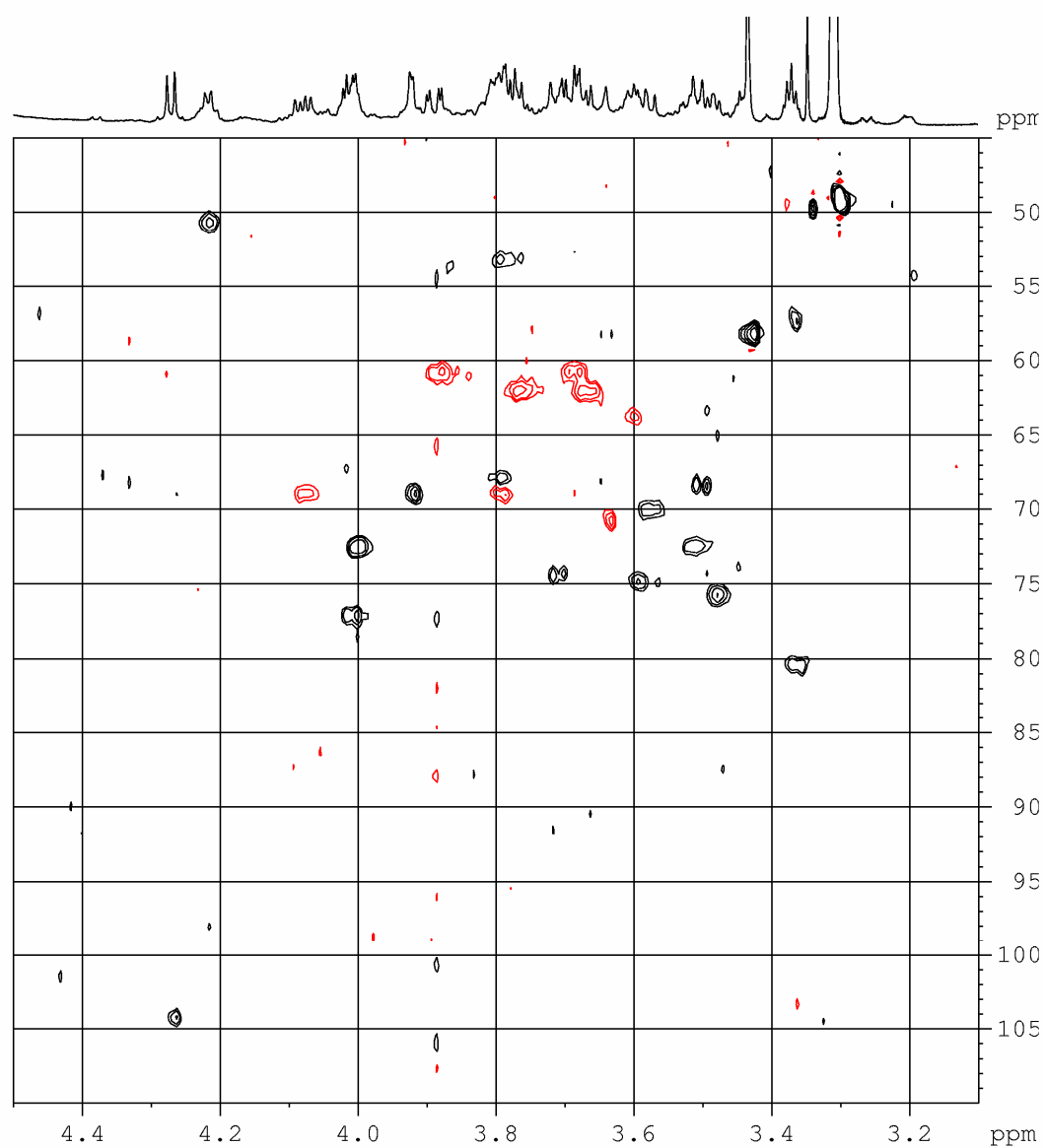
Spettro COSY del composto **3** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ a 700 MHz



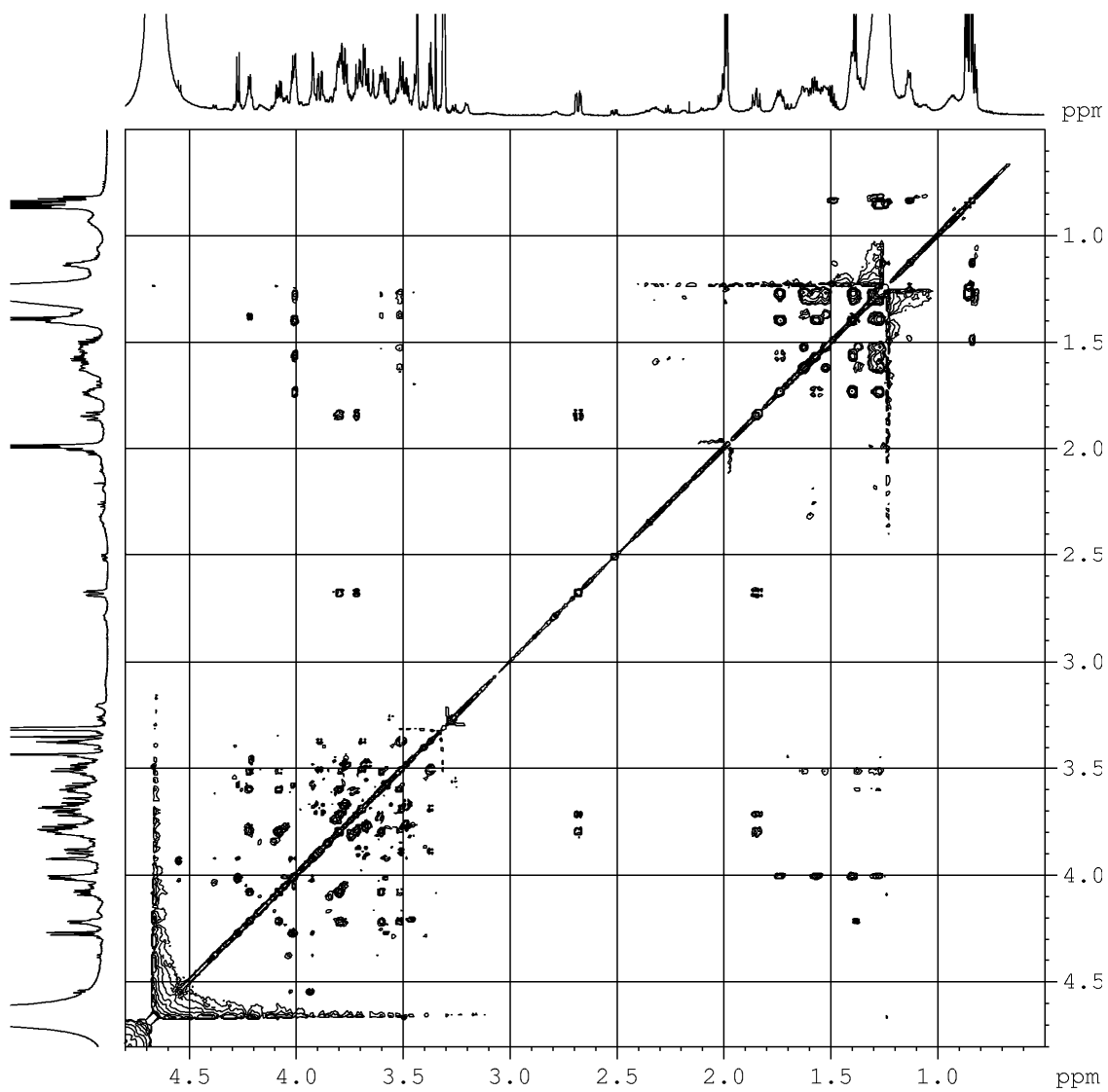
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **3** in CD₃OD/CDCl₃ a 700 MHz



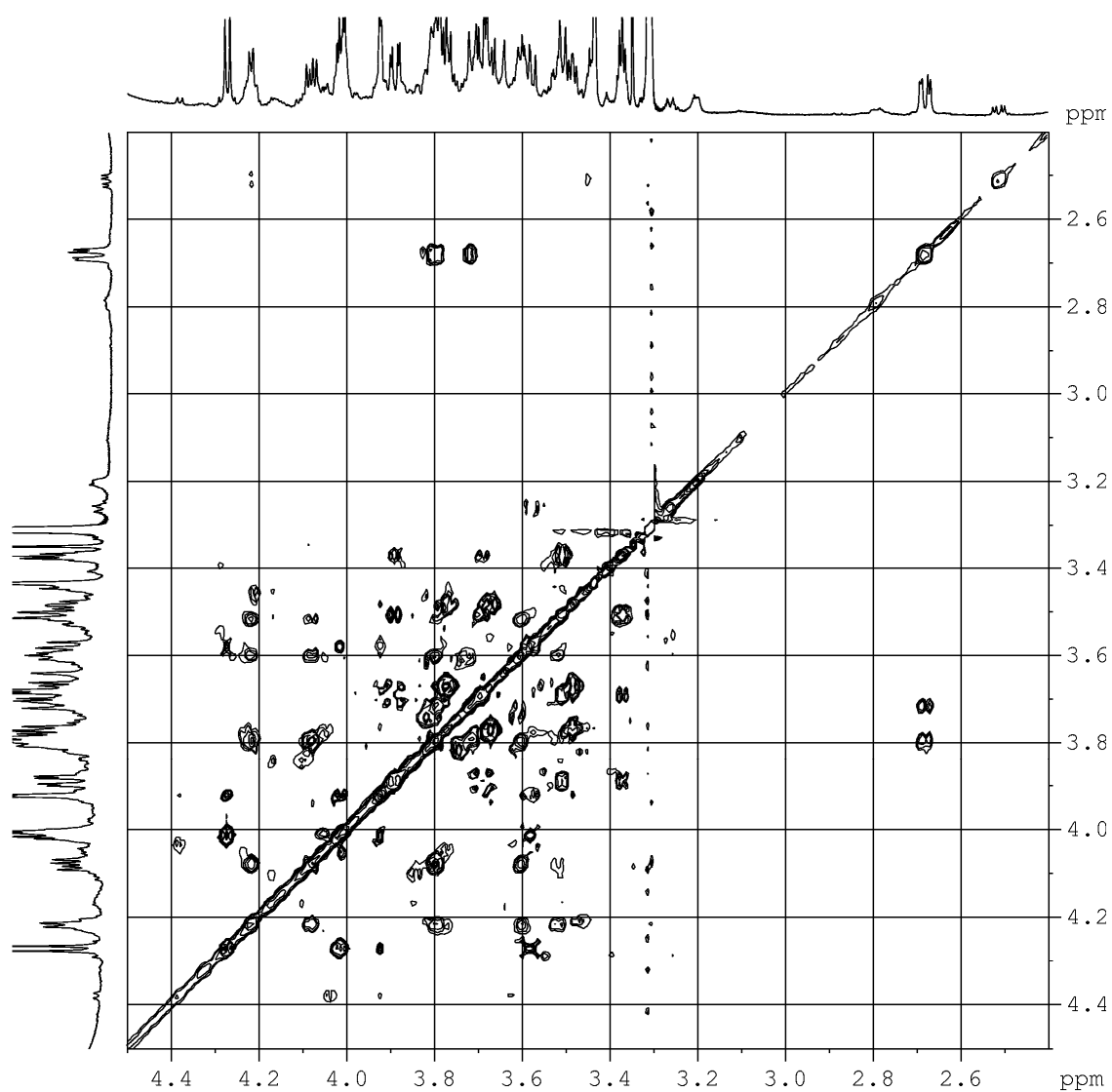
Spettro HSQC del composto **3** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ a 700 MHz



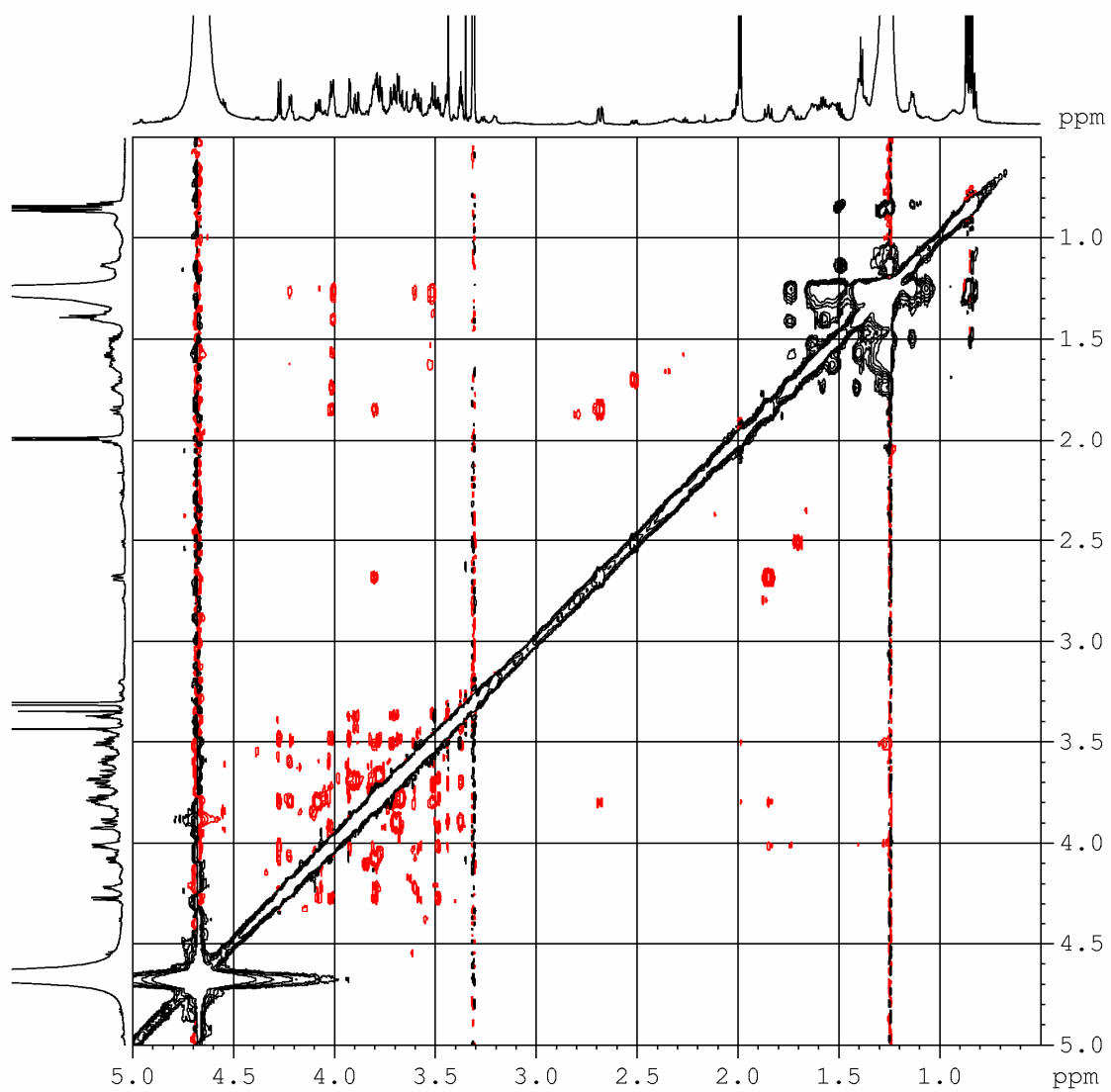
Regione a campi bassi dello spettro HSQC
del composto **3** in CD₃OD/CDCl₃ a 700 MHz



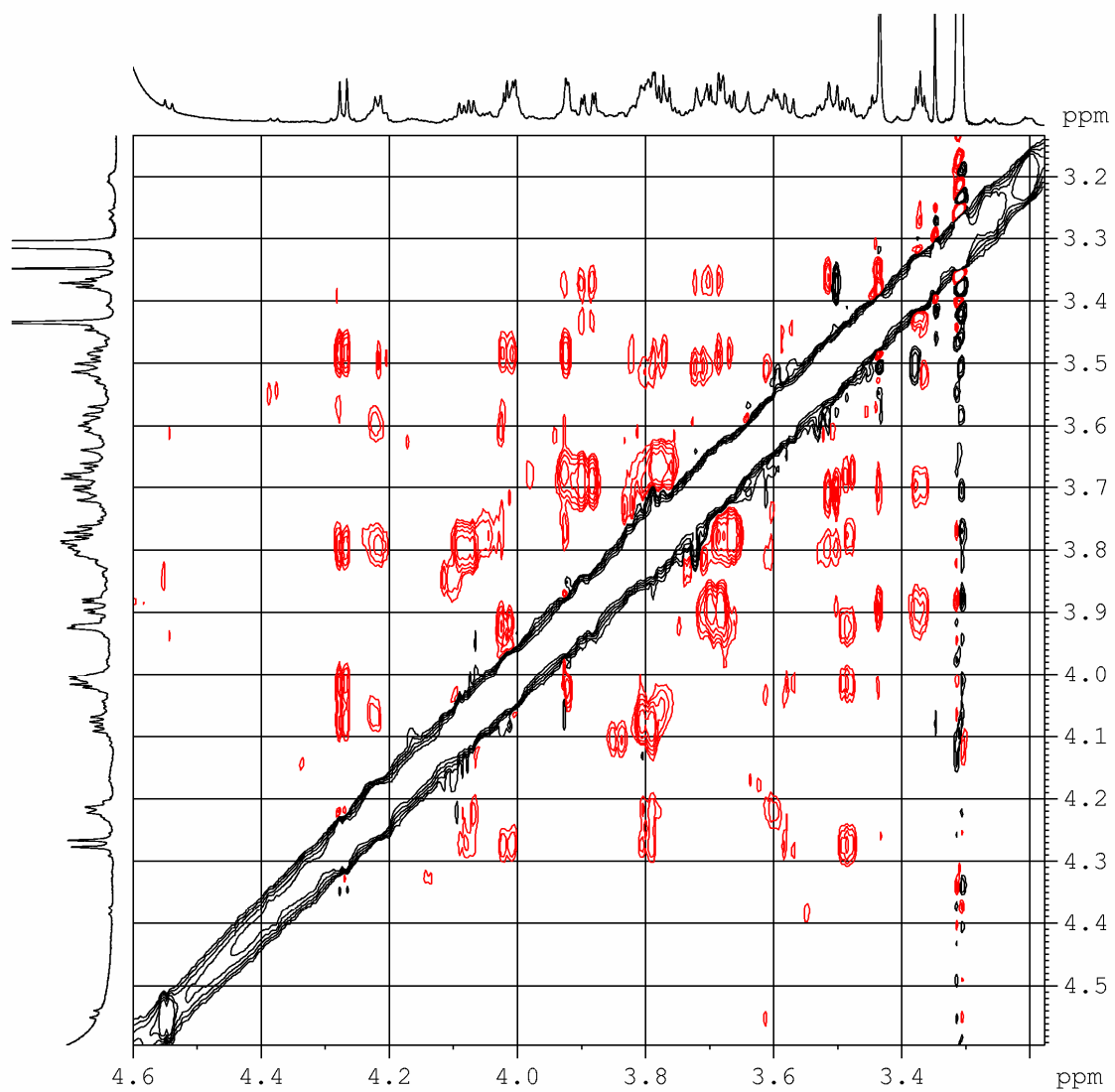
Spettro TOCSY del composto **3** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ a 700 MHz



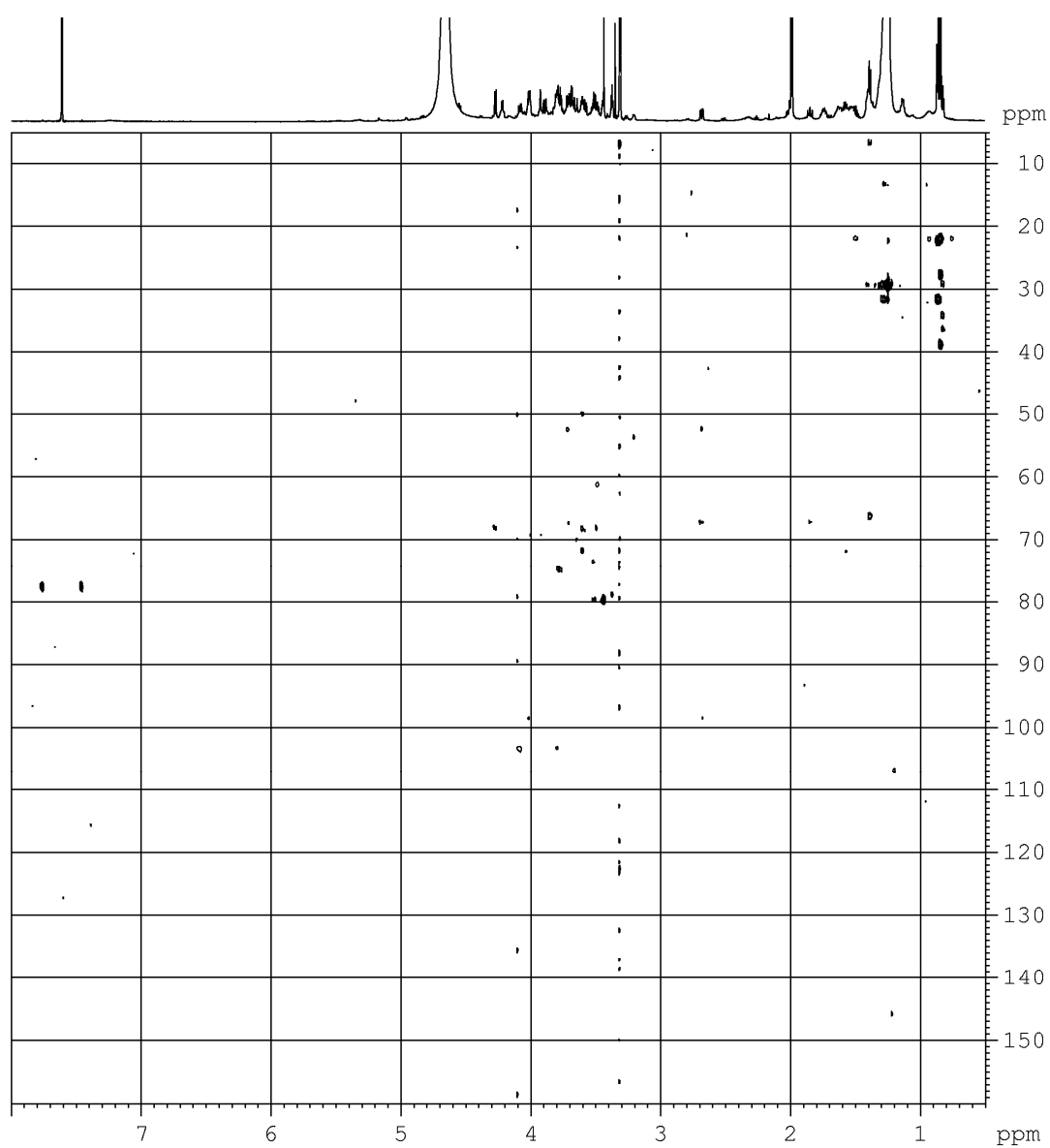
Regione a campi medi dello spettro TOCSY
del composto **3** in CD₃OD/CDCl₃ a 700 MHz



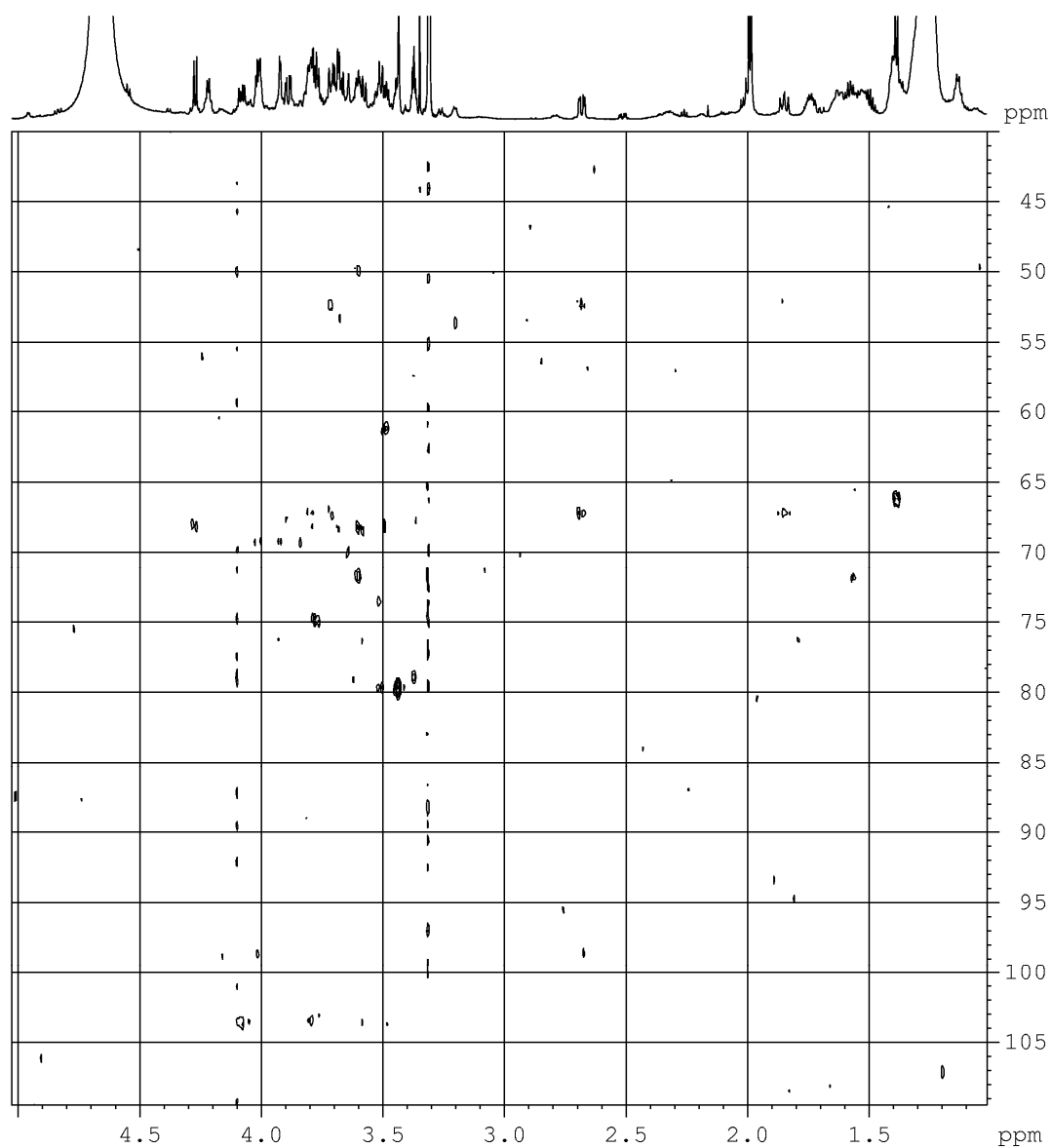
Spettro ROESY del composto **3** in CD₃OD/CDCl₃ a 700 MHz



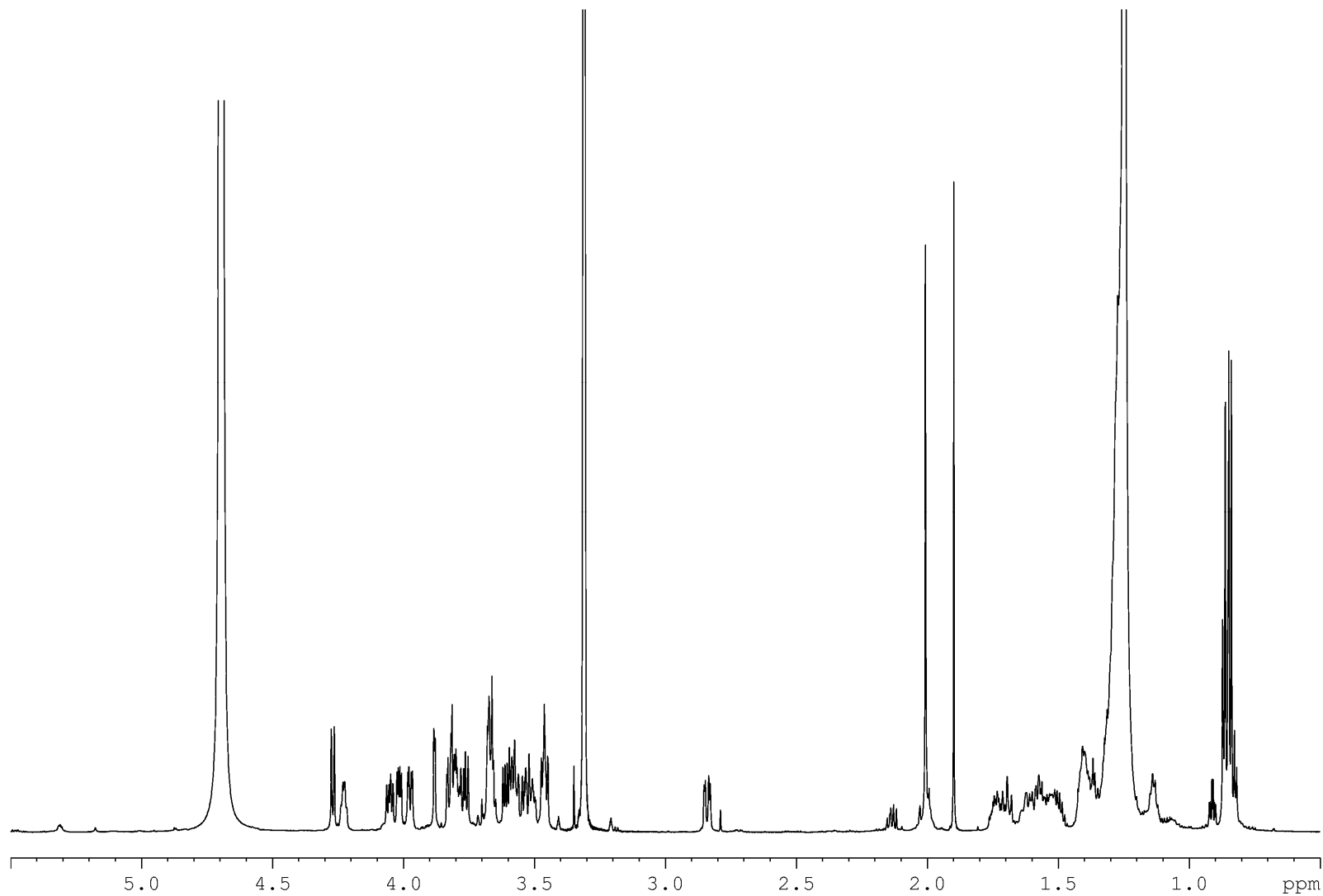
Regione a campi medi dello spettro ROESY
del composto **3** in CD₃OD/CDCl₃ a 700 MHz



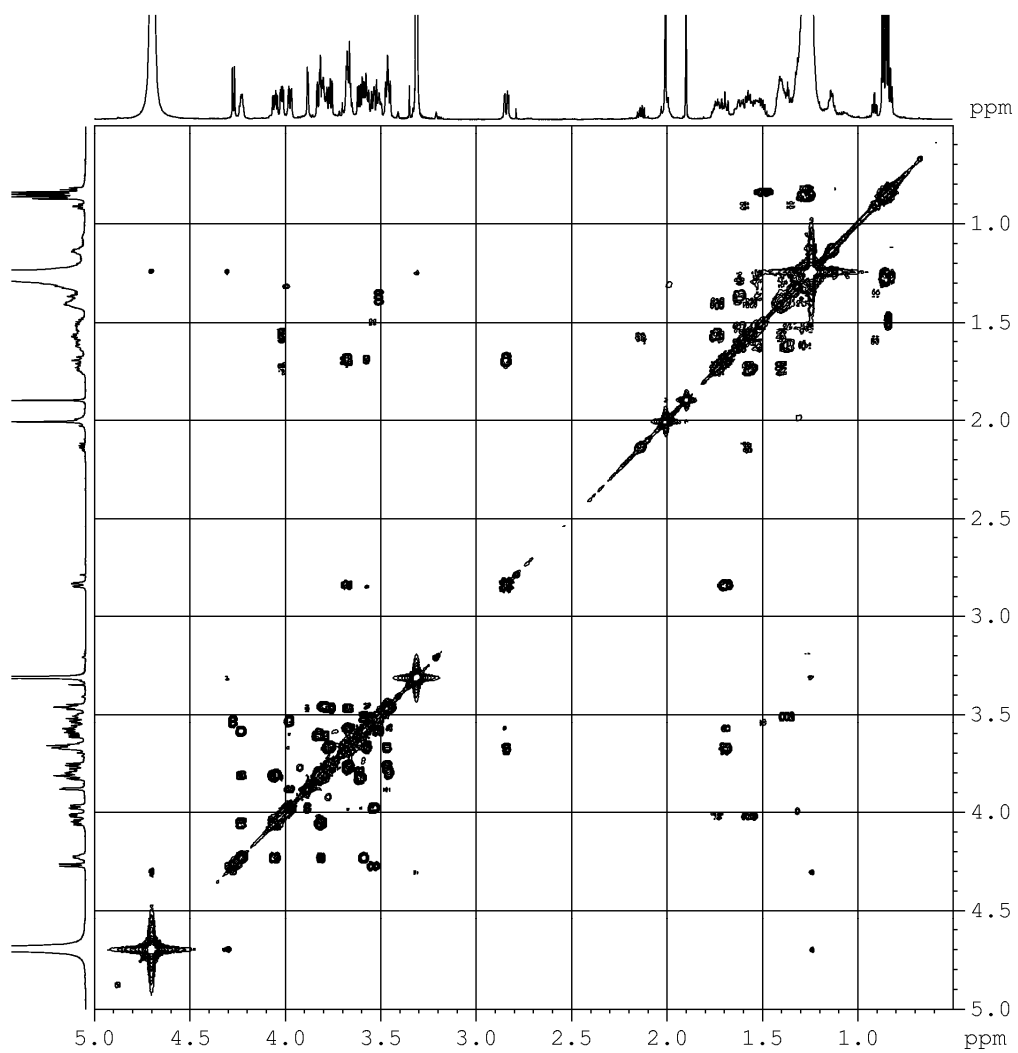
Spettro HMBC del composto **3** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ a 700 MHz



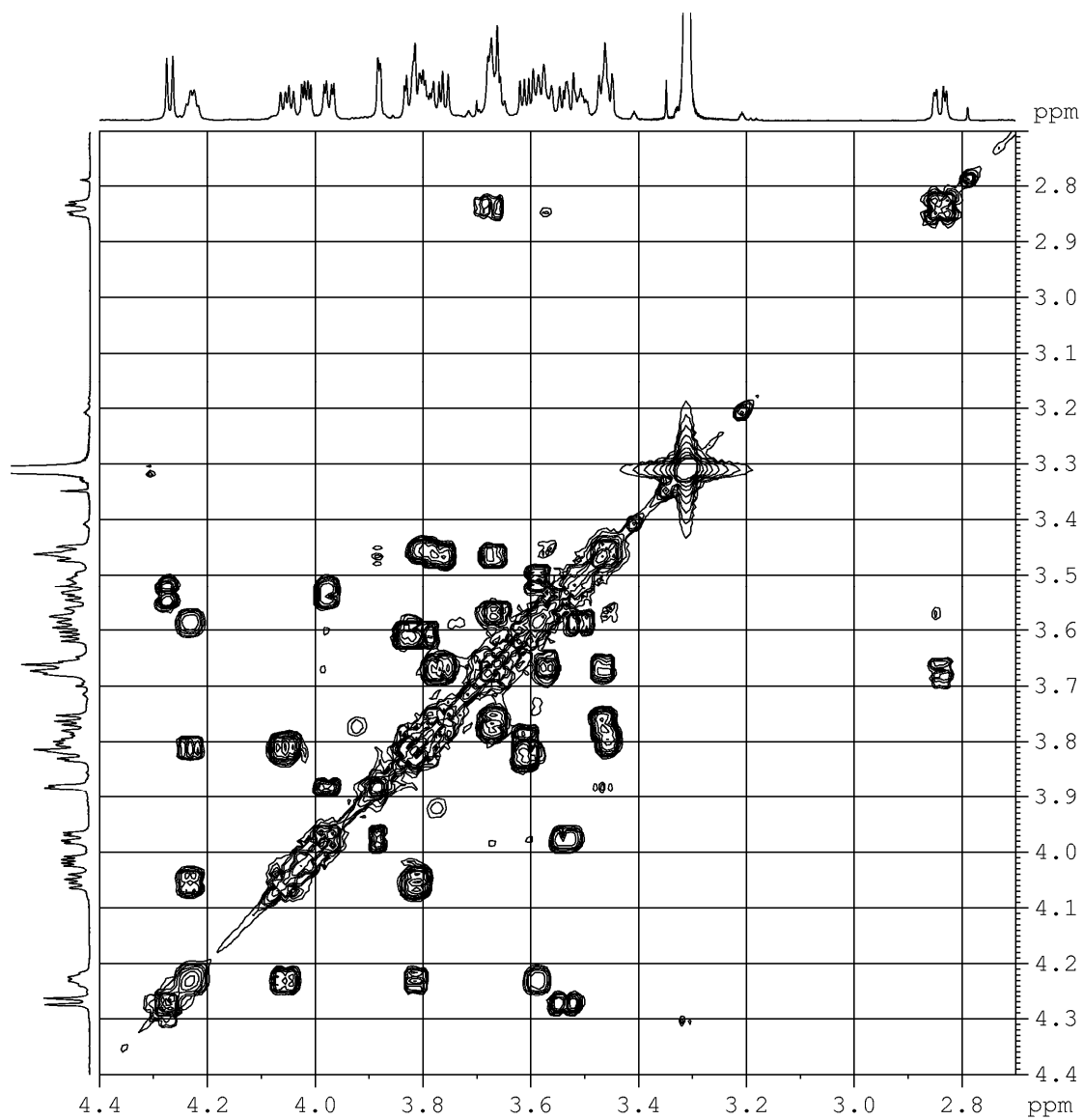
Ingrandimento dello spettro HMBC del composto **3**
in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ a 700 MHz



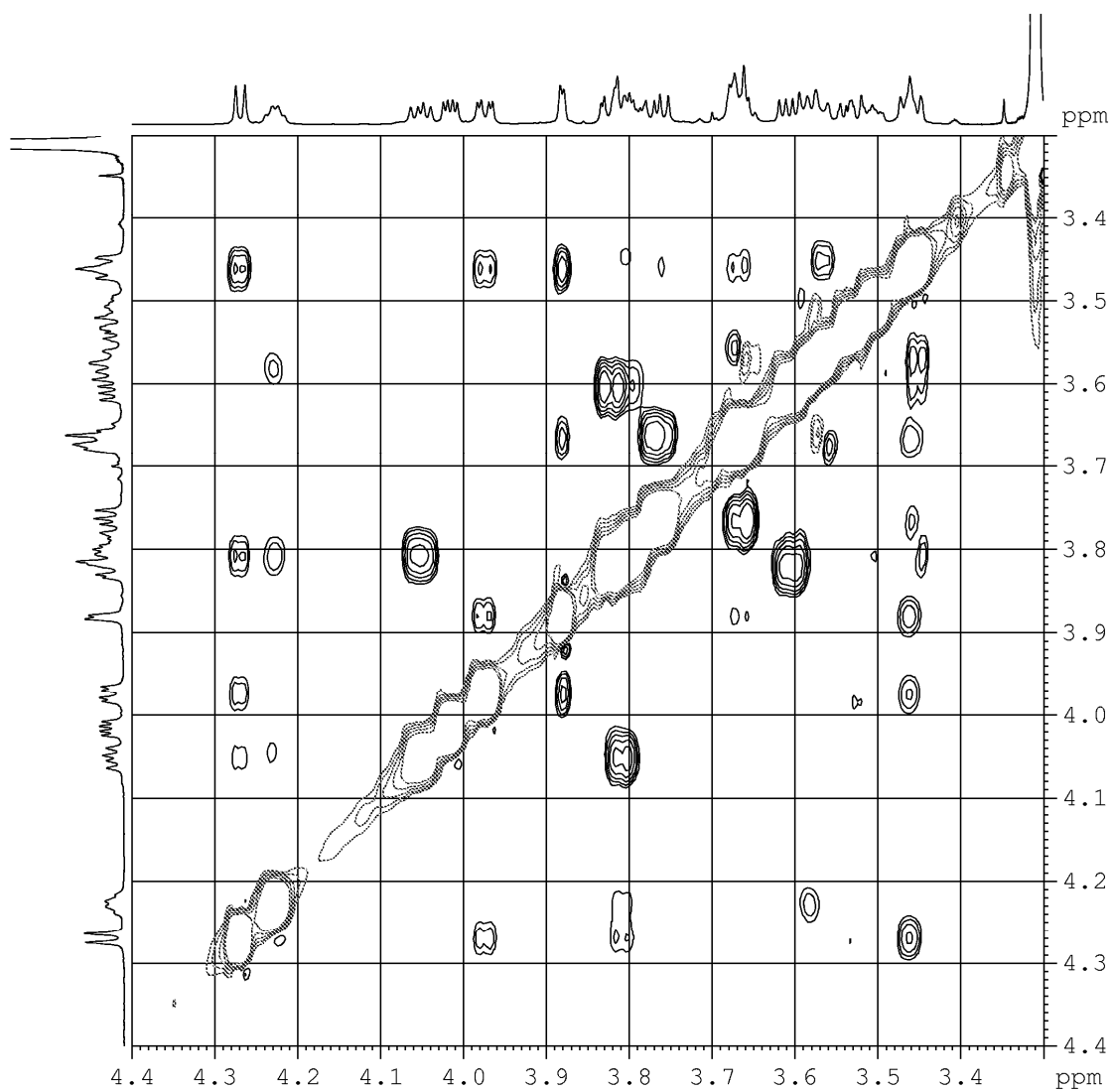
Spettro ^1H -NMR del composto **4** in CD_3OD a 700 MHz



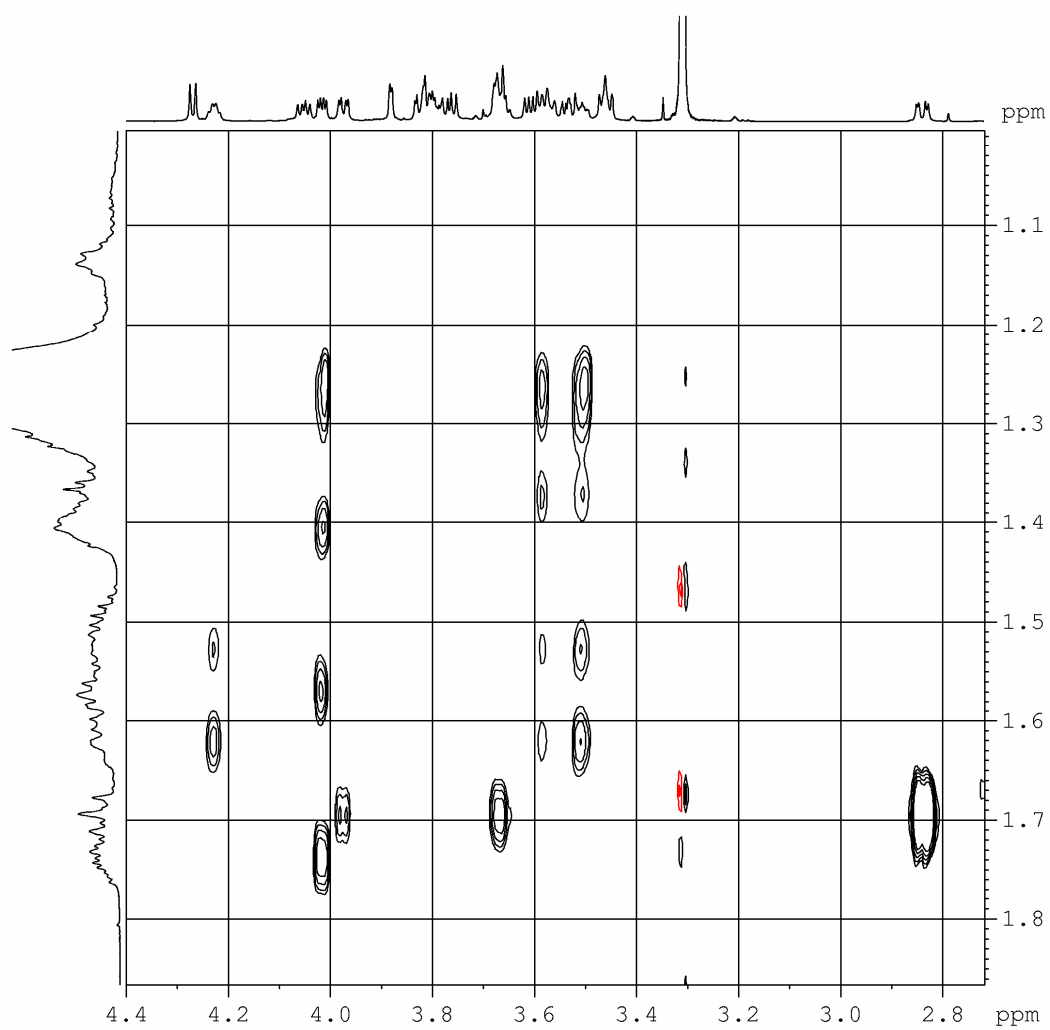
Spettro COSY del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



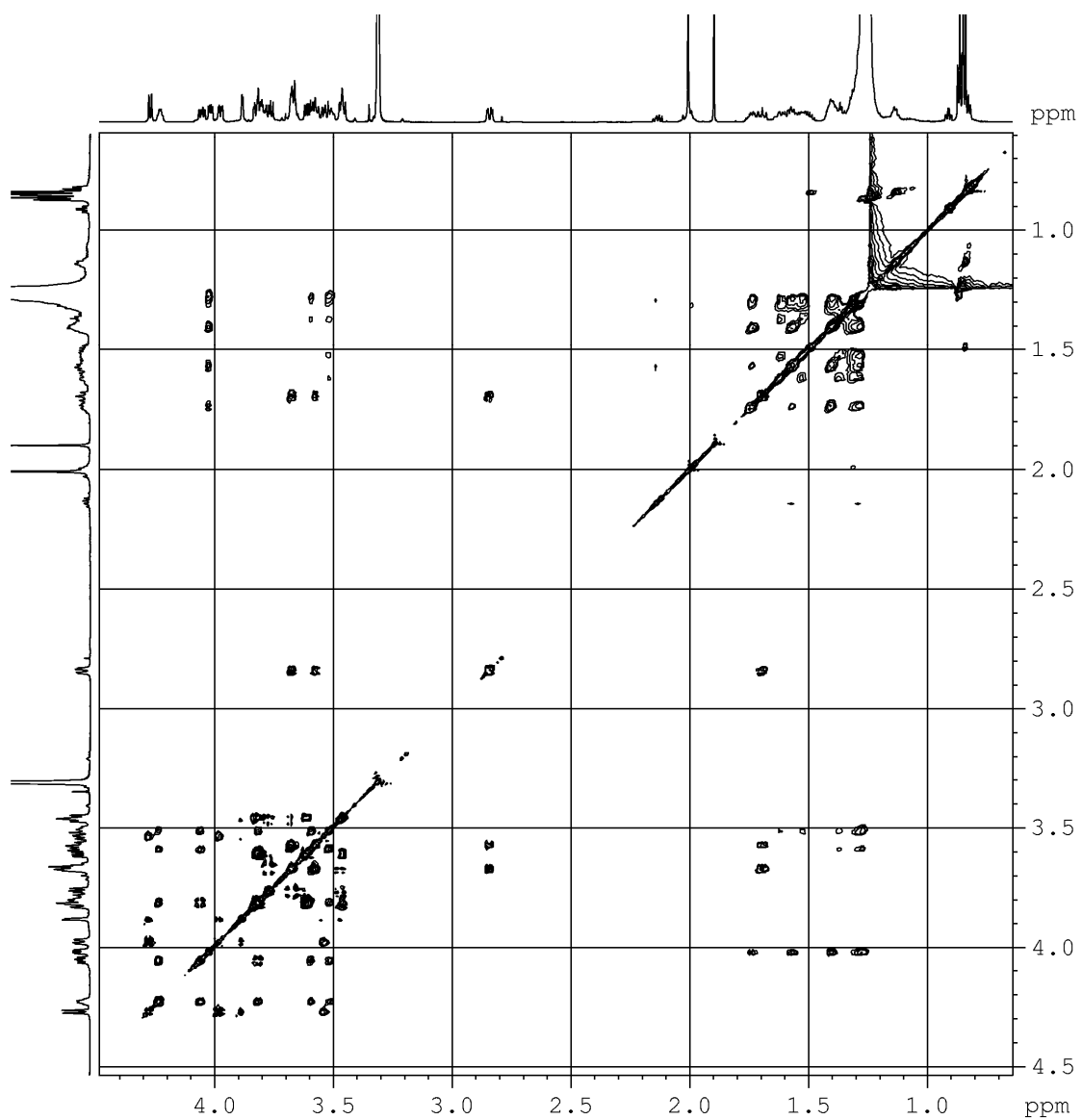
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



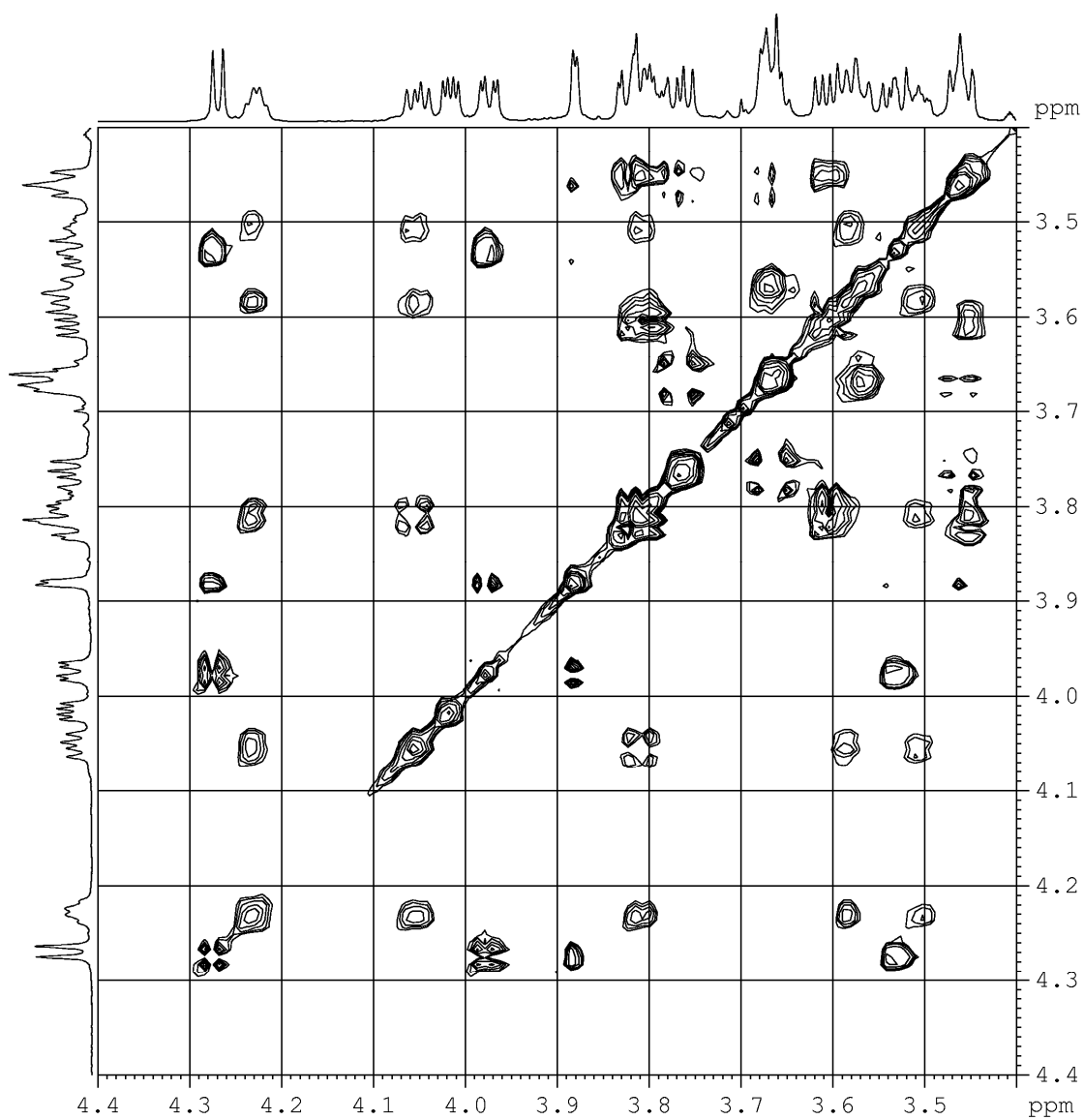
Regione a campi medi dello spettro ROESY
del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



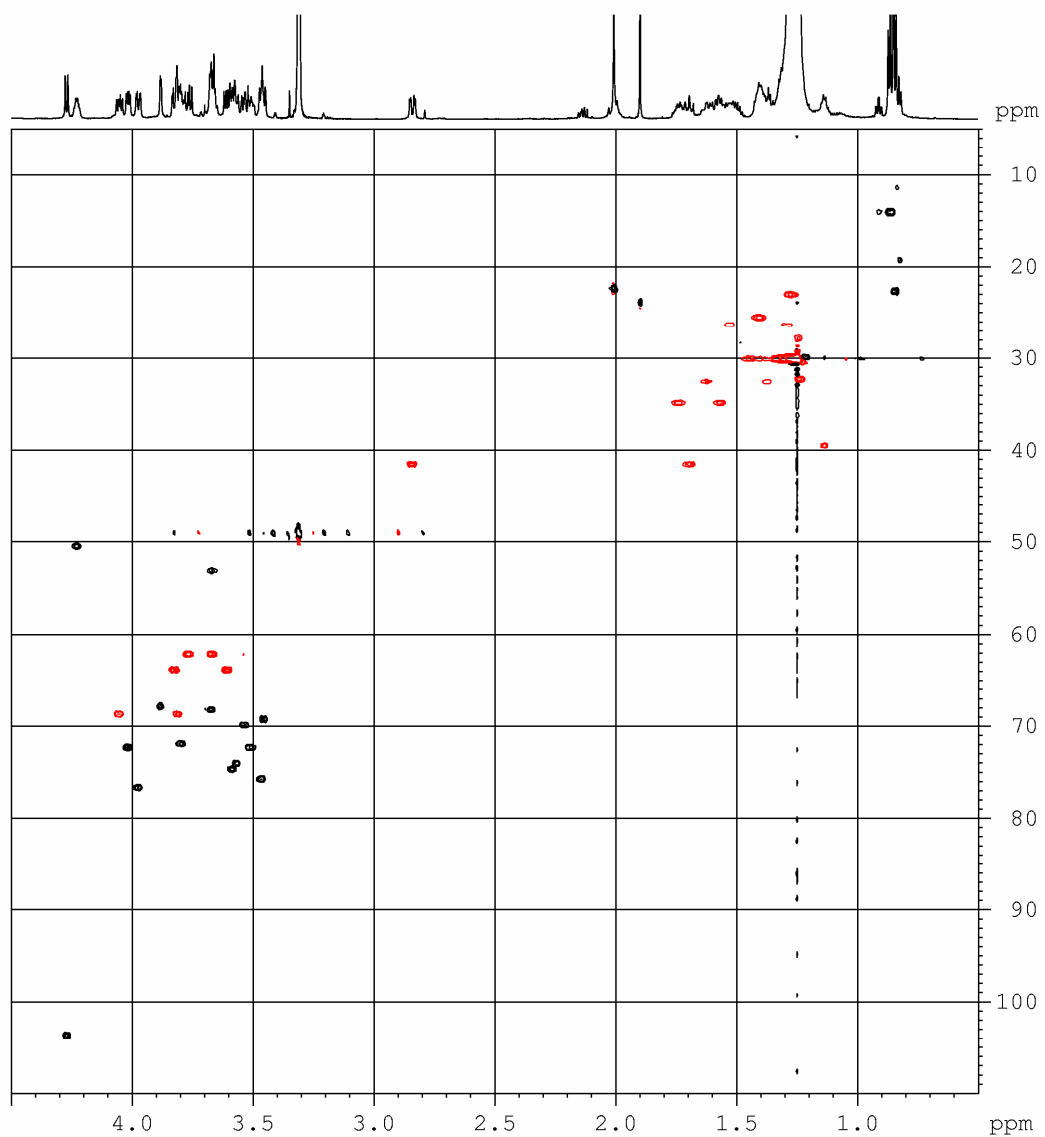
Ingrandimento dello spettro ROESY
del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



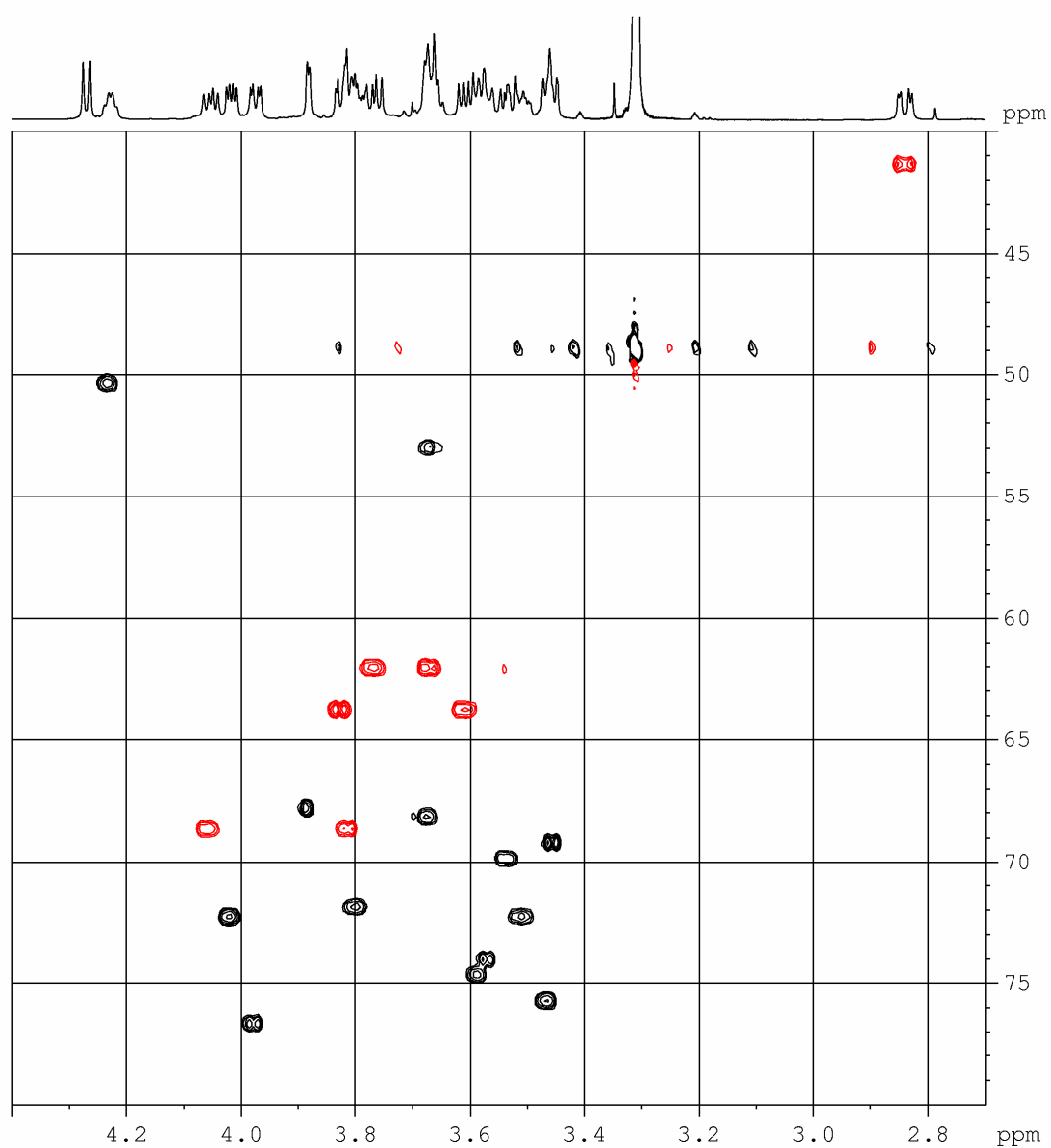
Spettro TOCSY del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



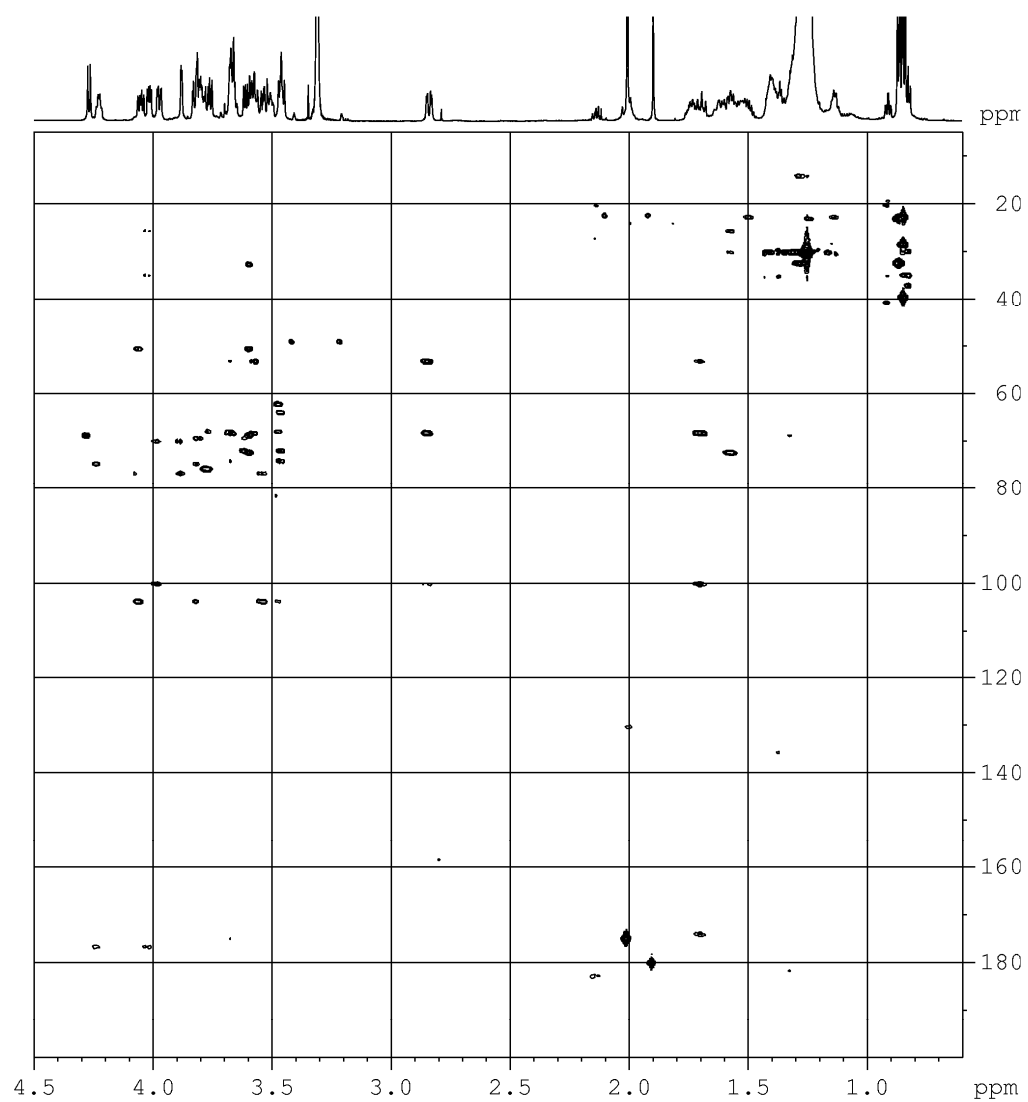
Regione a campi medi dello spettro TOCSY
del composto **4** in CD_3OD a 700 MHz



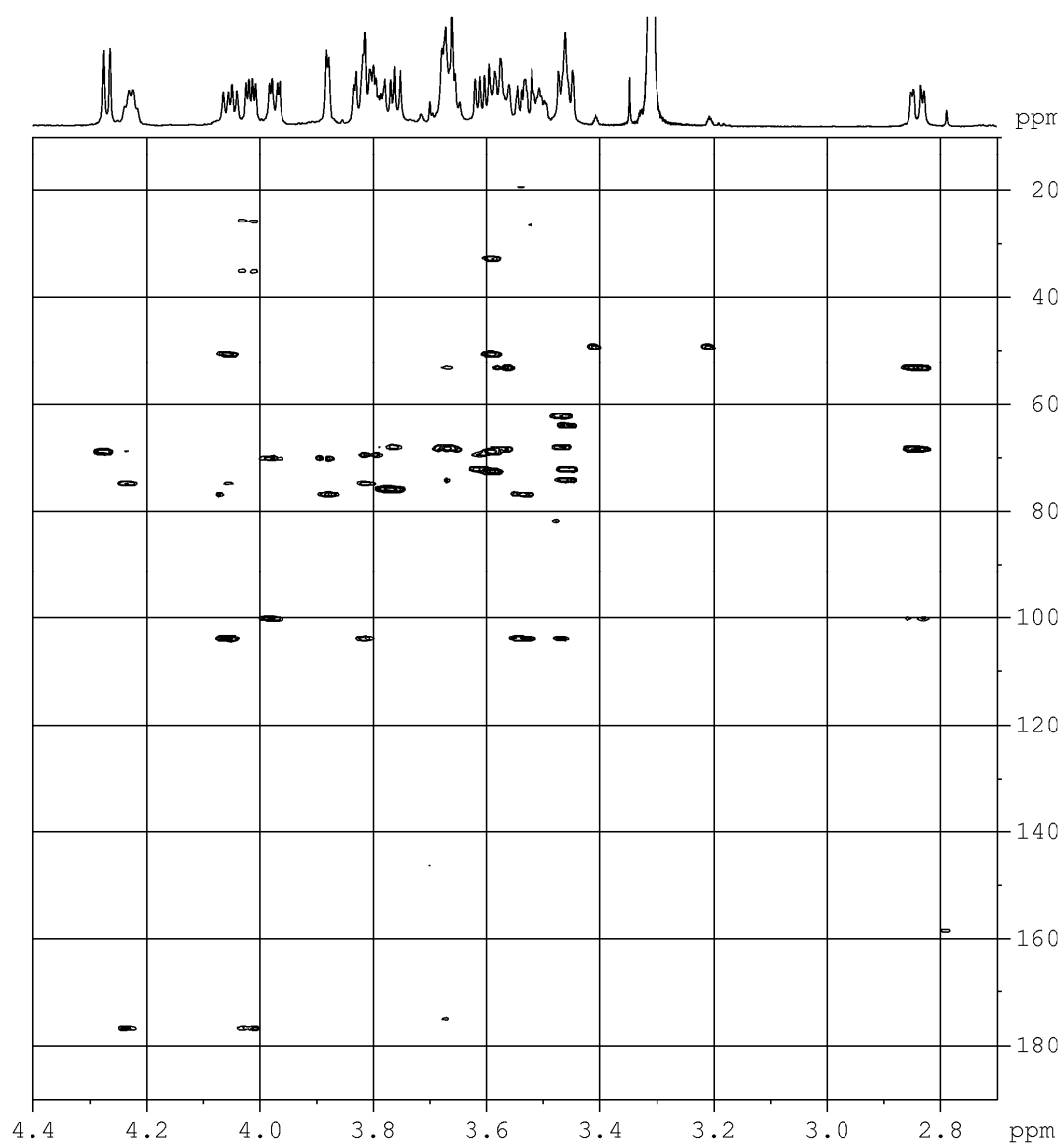
Spettro HSQC del composto **4** in CD_3OD a 700 MHz



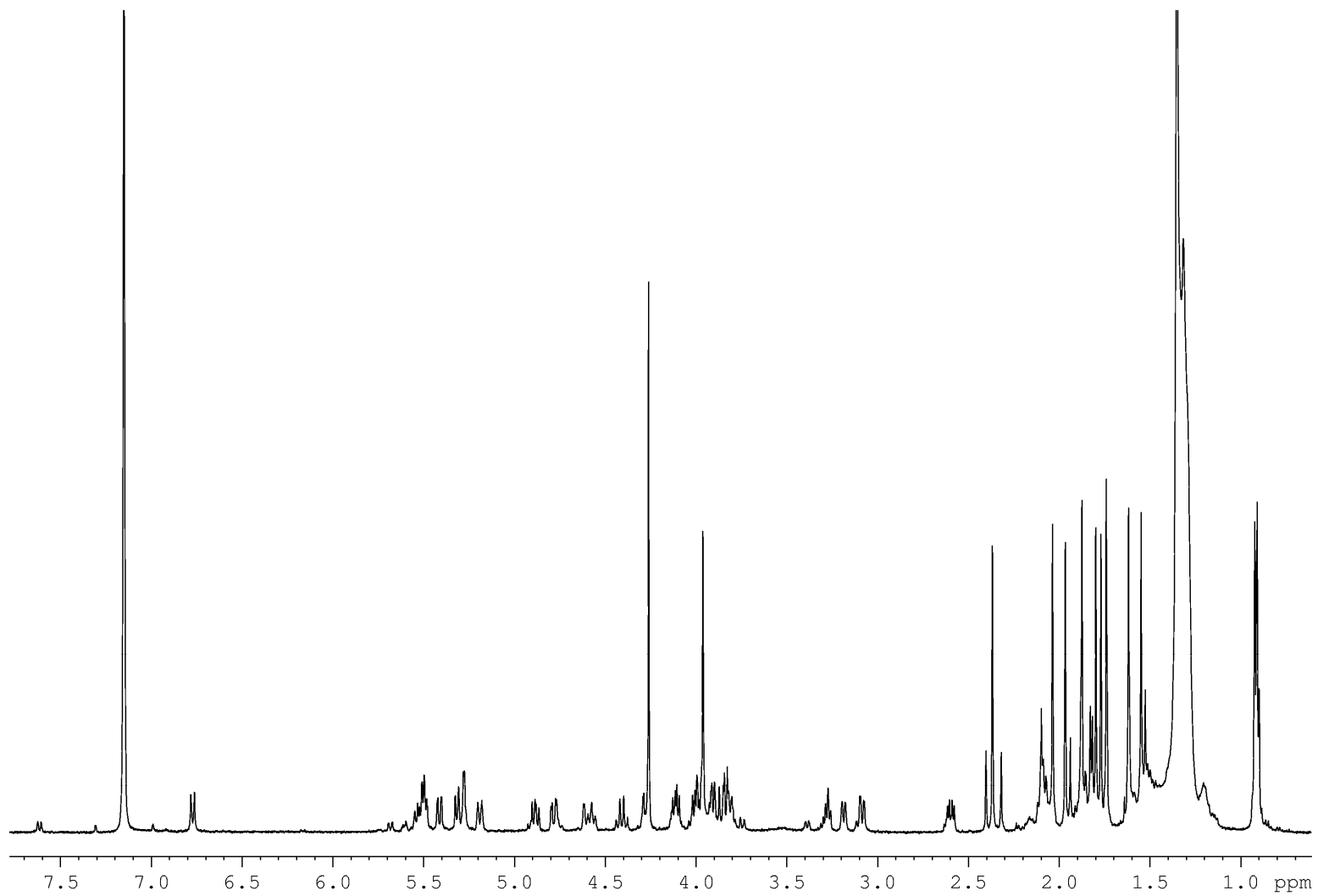
Regione a campi medi dello spettro HSQC
del composto **4** in CD_3OD a 700 MHz



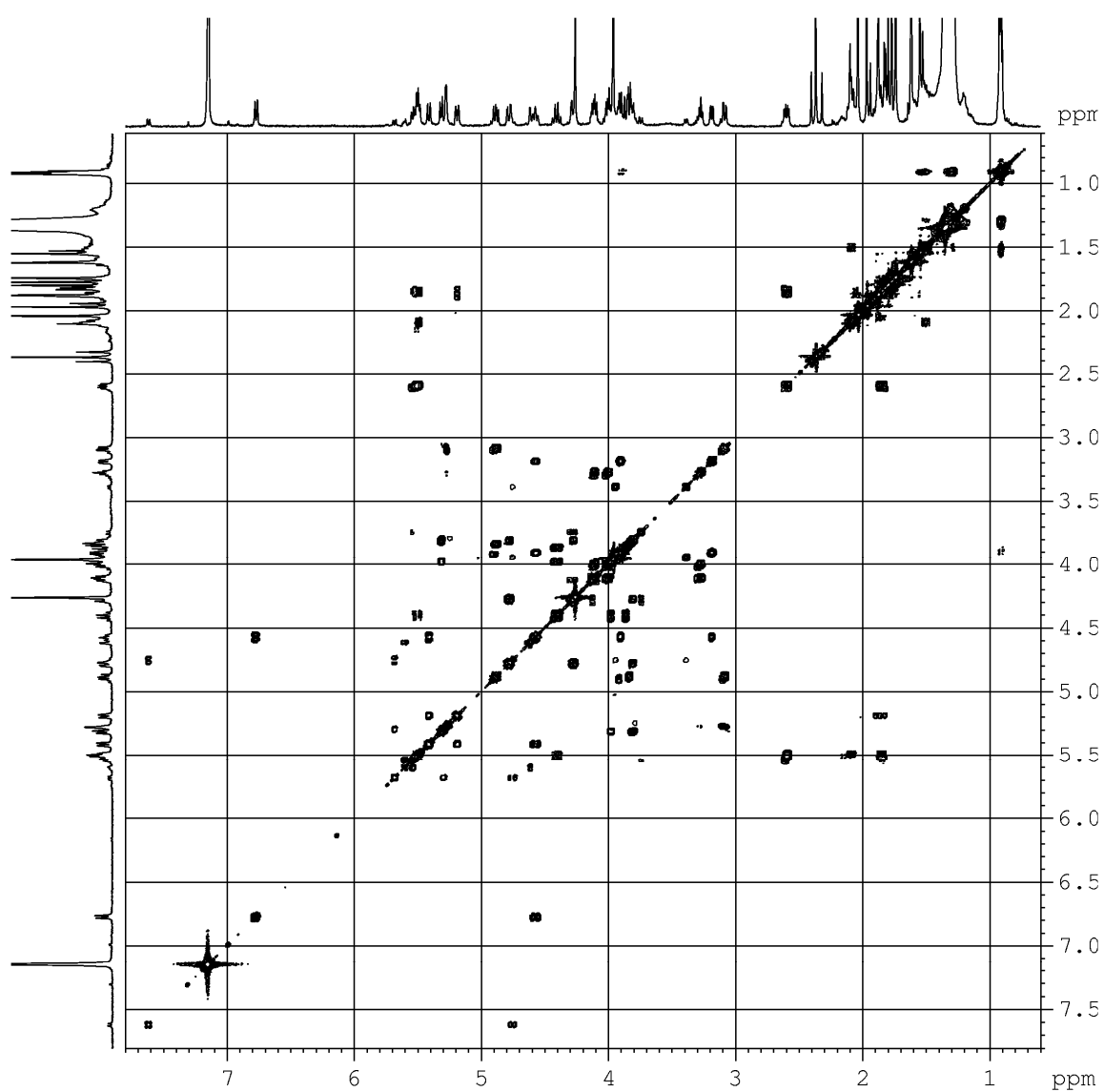
Spettro HMBC del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



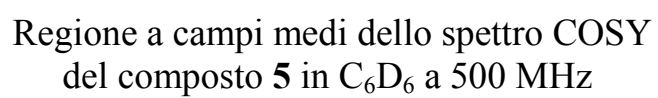
Regione a campi medi dello spettro HMBC
del composto **4** in CD₃OD a 700 MHz



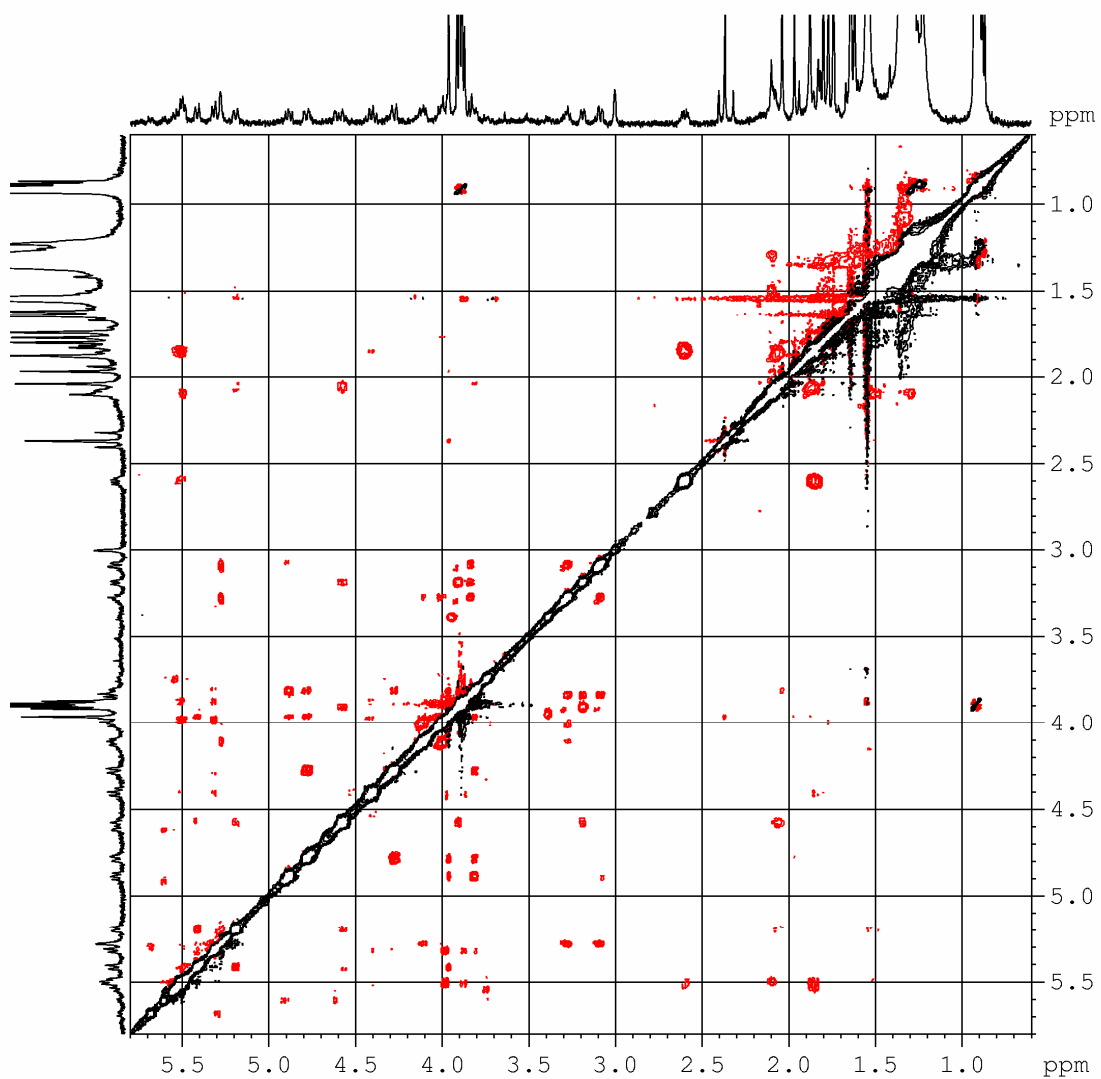
Spettro ^1H -NMR del composto **5** in C_6D_6 a 700 MHz



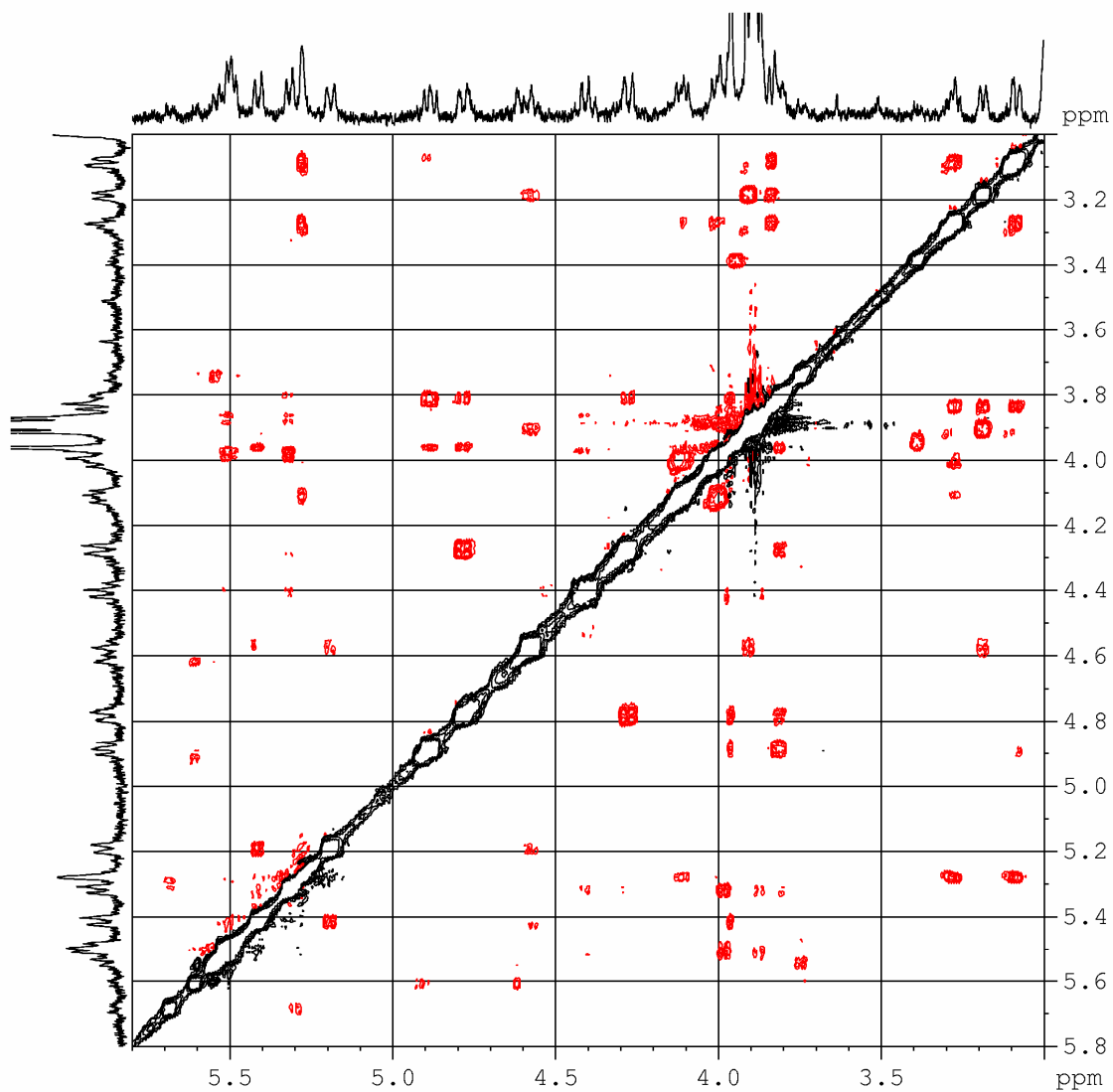
Spettro COSY del composto **5** in C_6D_6 a 500 MHz



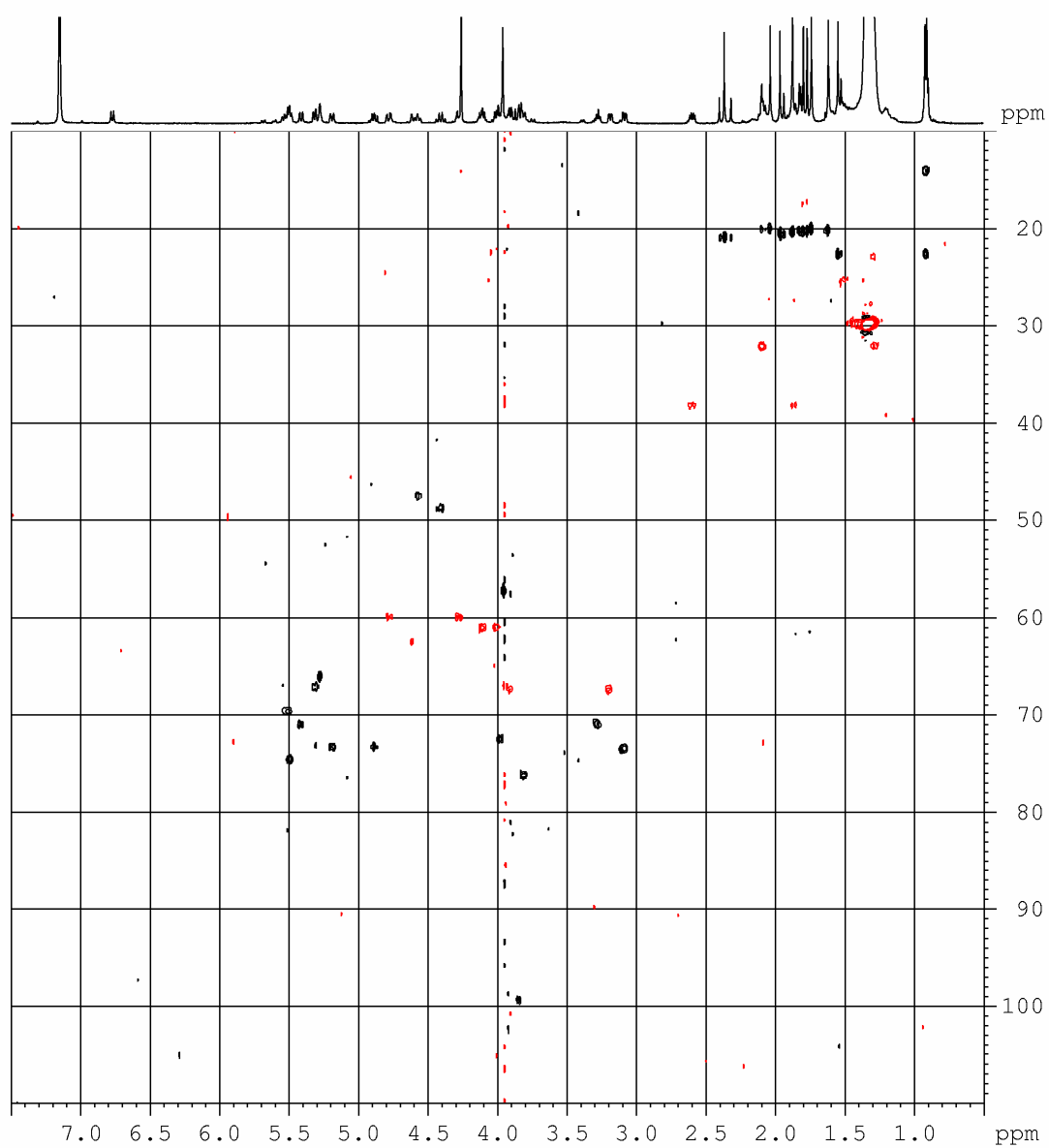
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **5** in C₆D₆ a 500 MHz



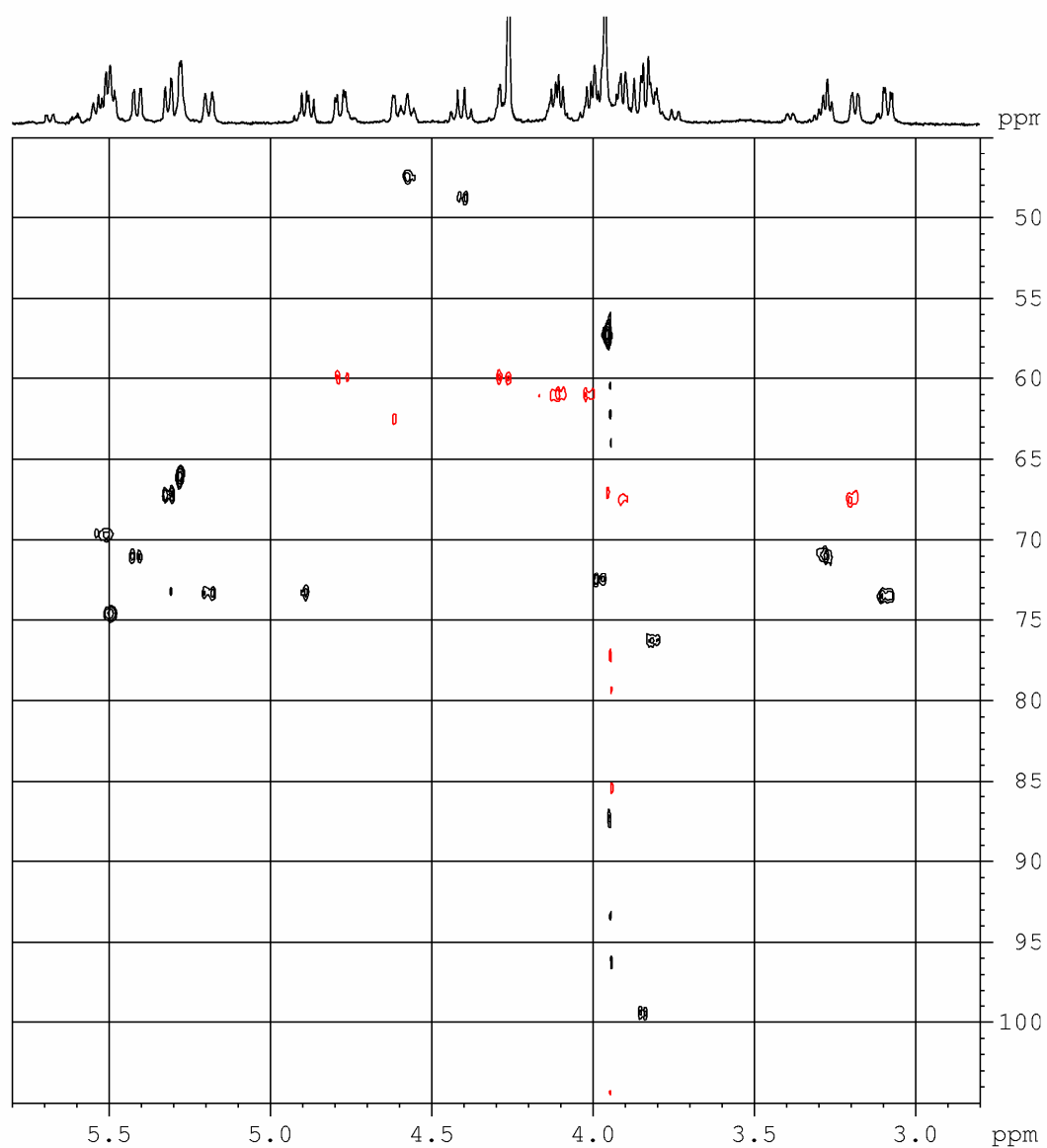
Spettro ROESY del composto **5** in C_6D_6 a 500 MHz



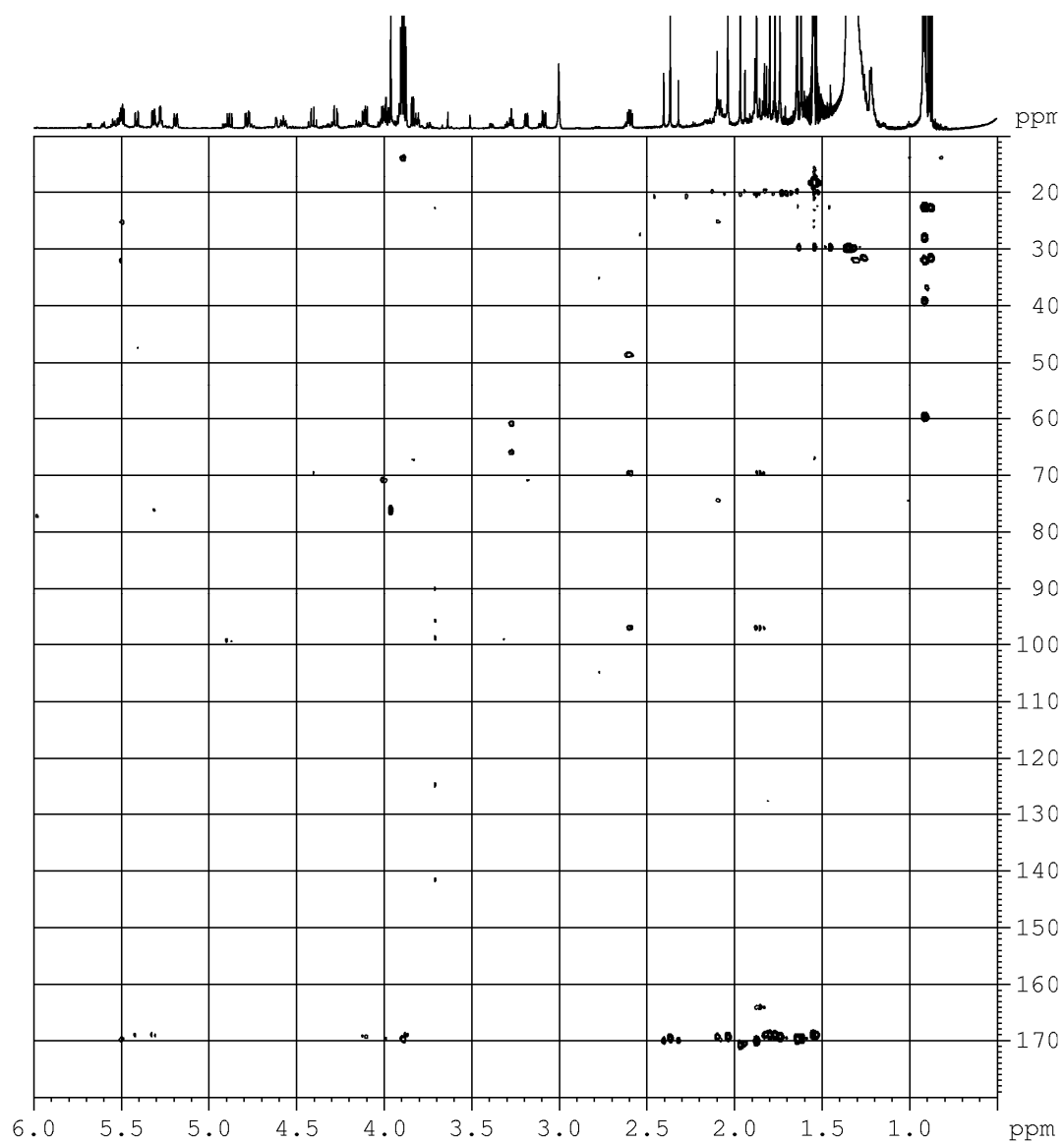
Regione a campi medi dello spettro ROESY
del composto **5** in C₆D₆ a 500 MHz



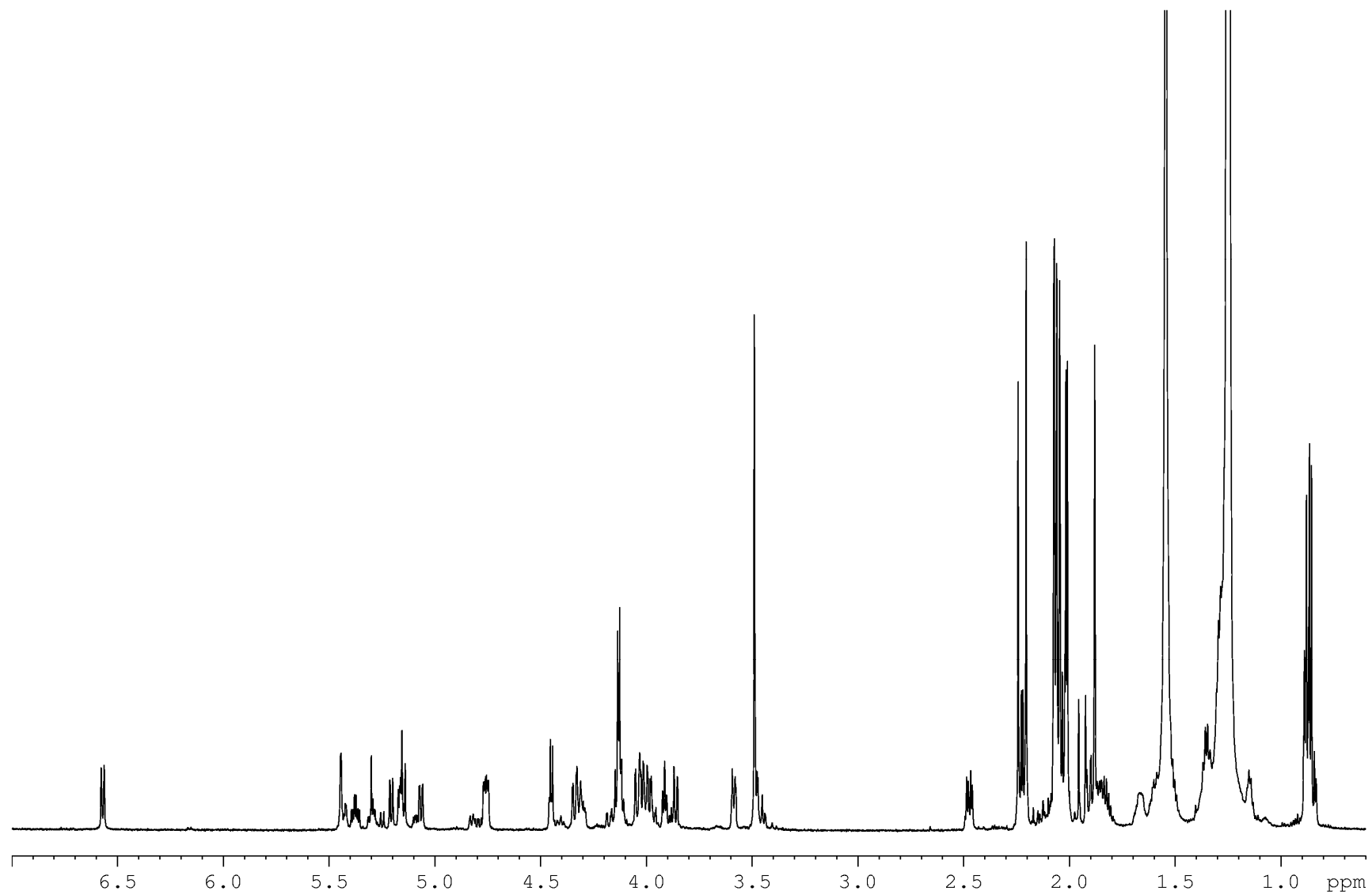
Spettro HSQC del composto **5** in C_6D_6 a 700 MHz



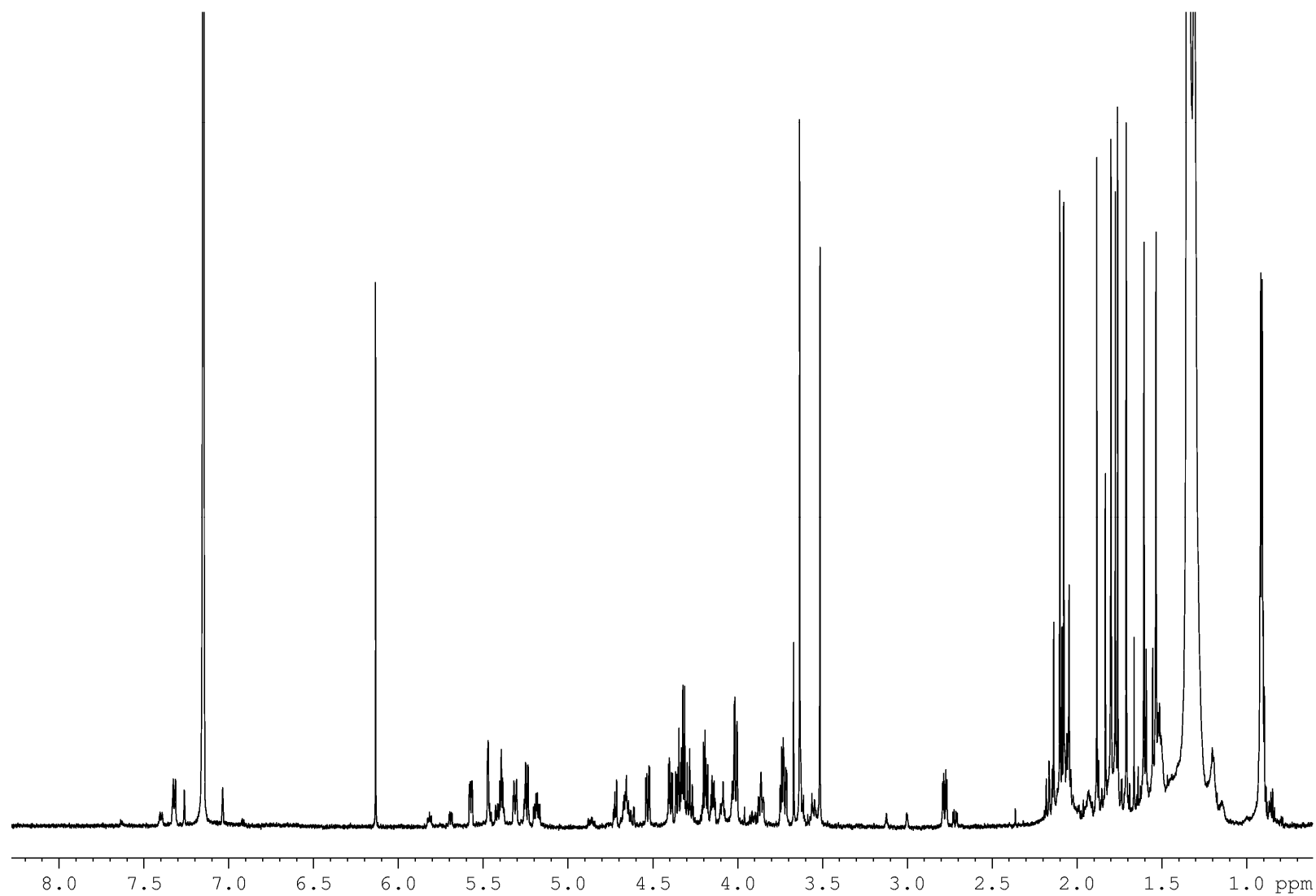
Regione a campi medi dello spettro HSQC
del composto **5** in C_6D_6 a 700 MHz



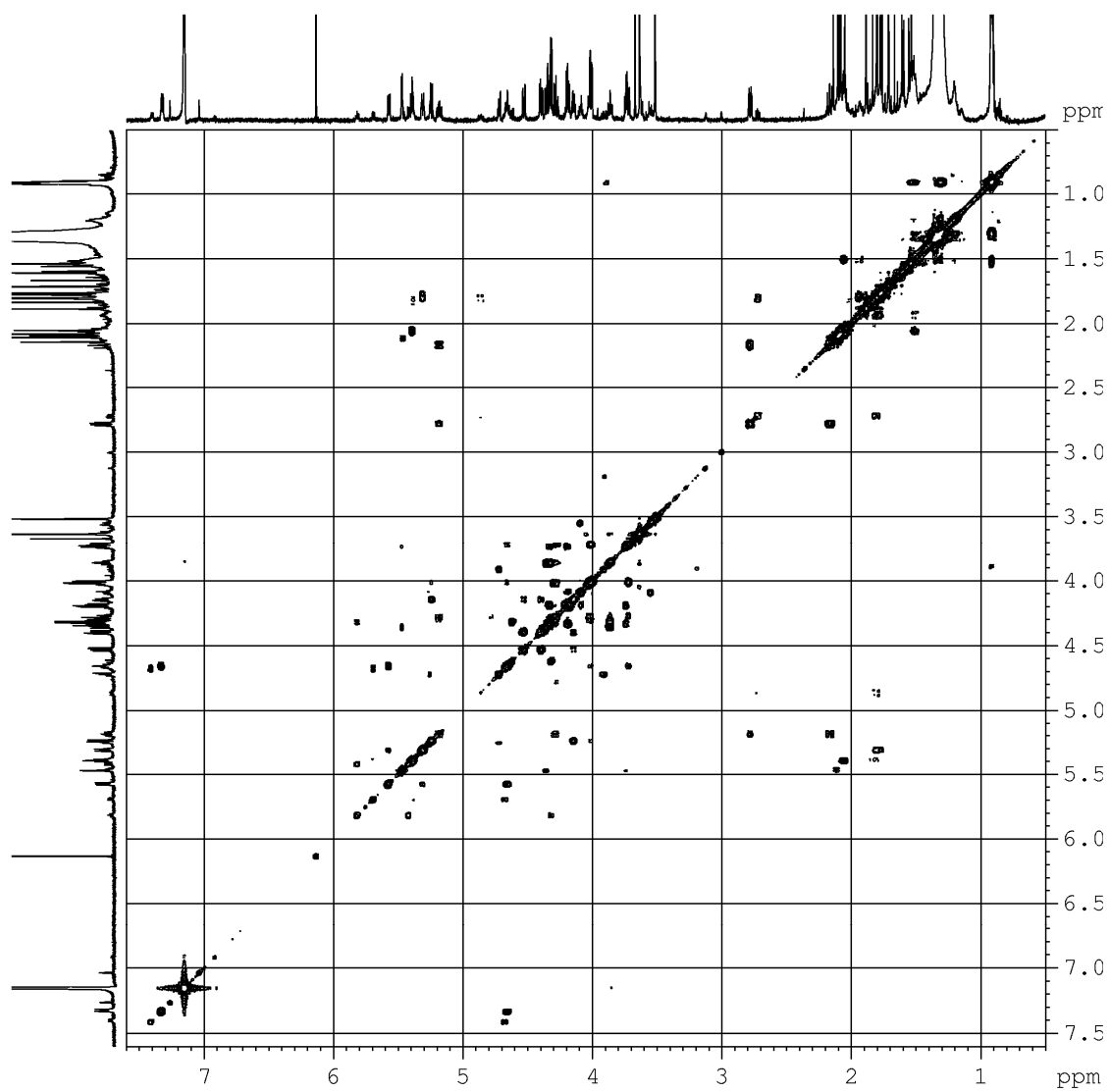
Spettro HMBC del composto **5** in C_6D_6 a 700 MHz



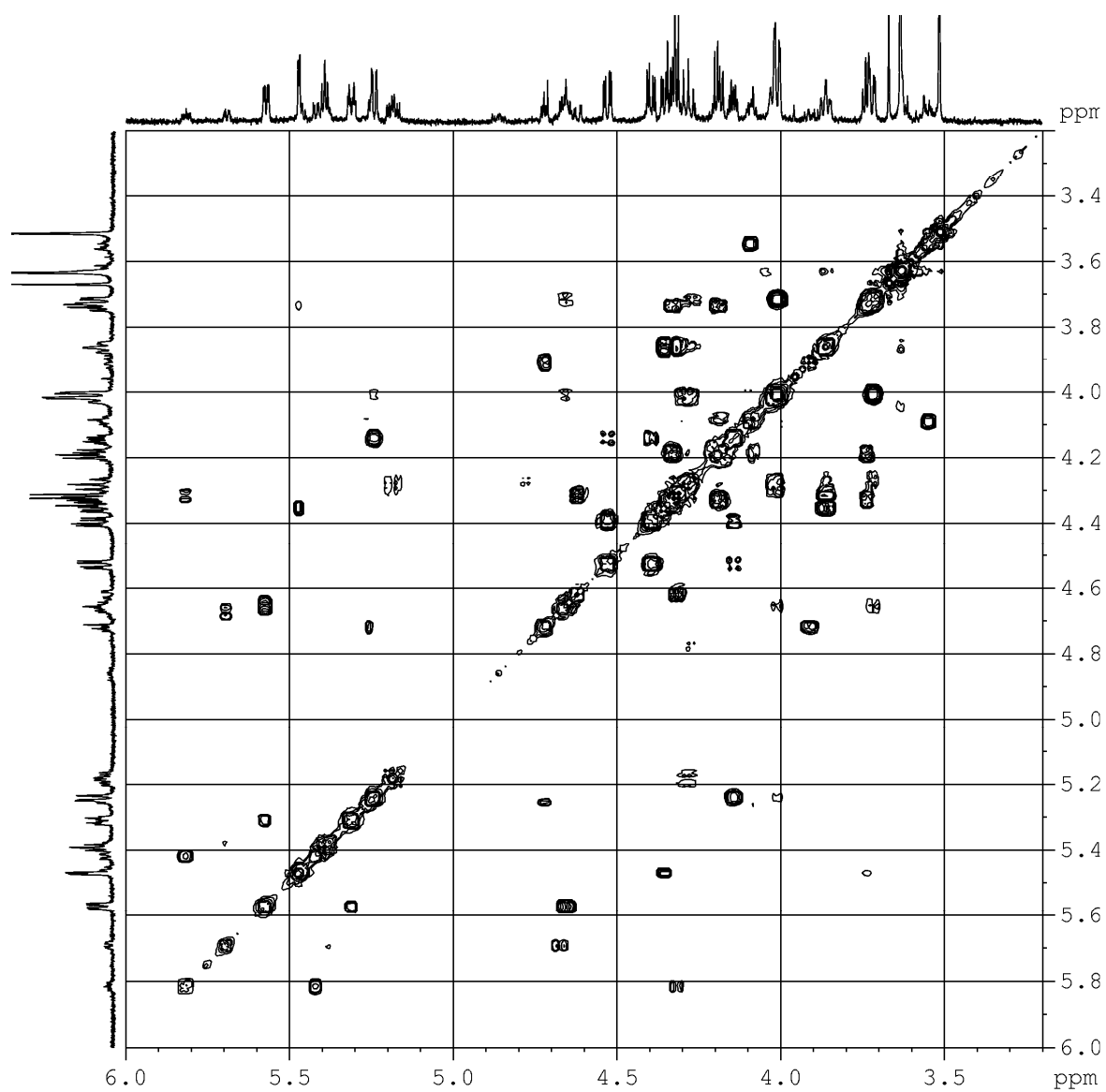
Spettro ^1H -NMR del composto **5** in CDCl_3 a 700 MHz



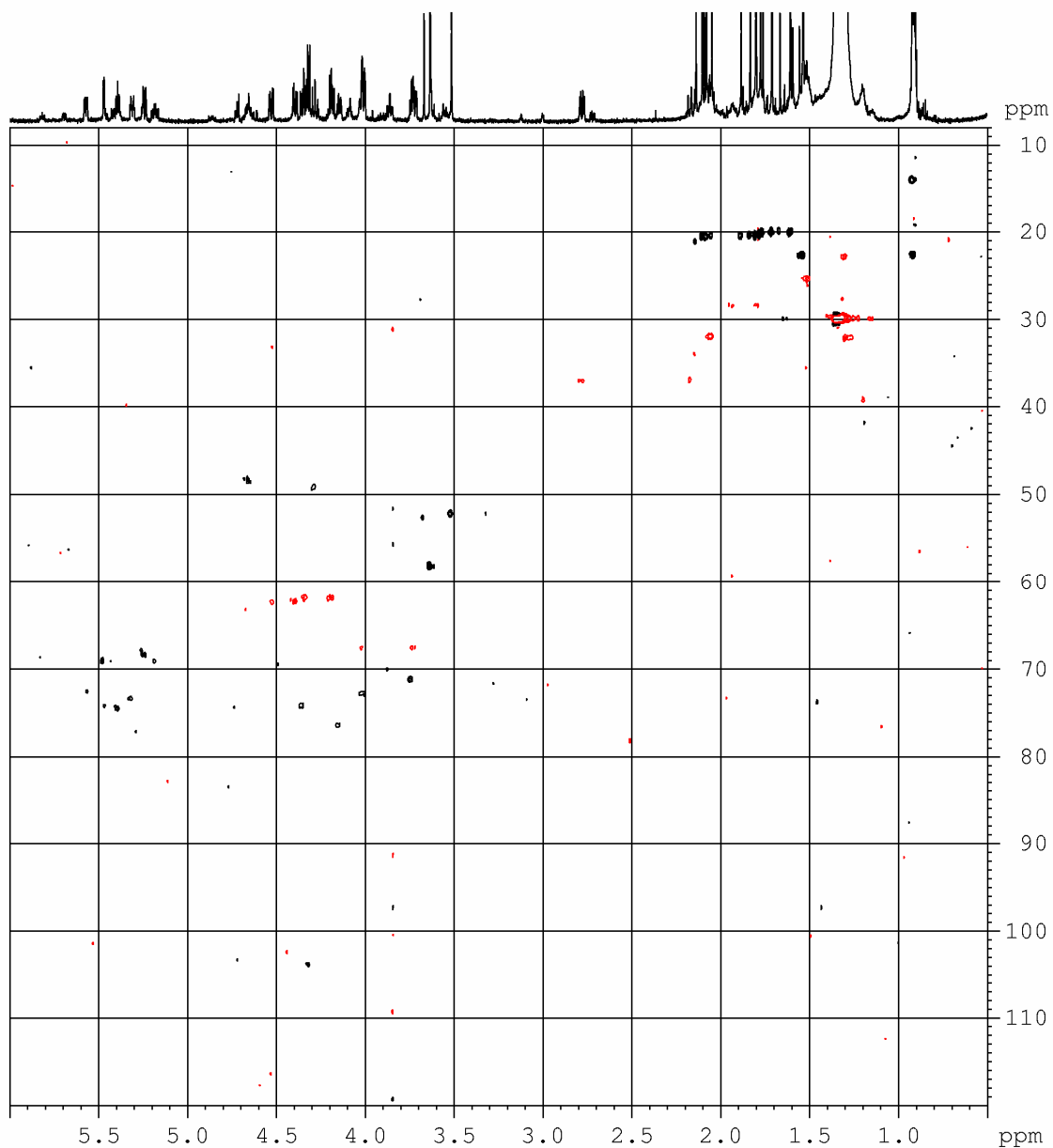
Spettro ^1H -NMR del composto **6** in C_6D_6 a 700 MHz



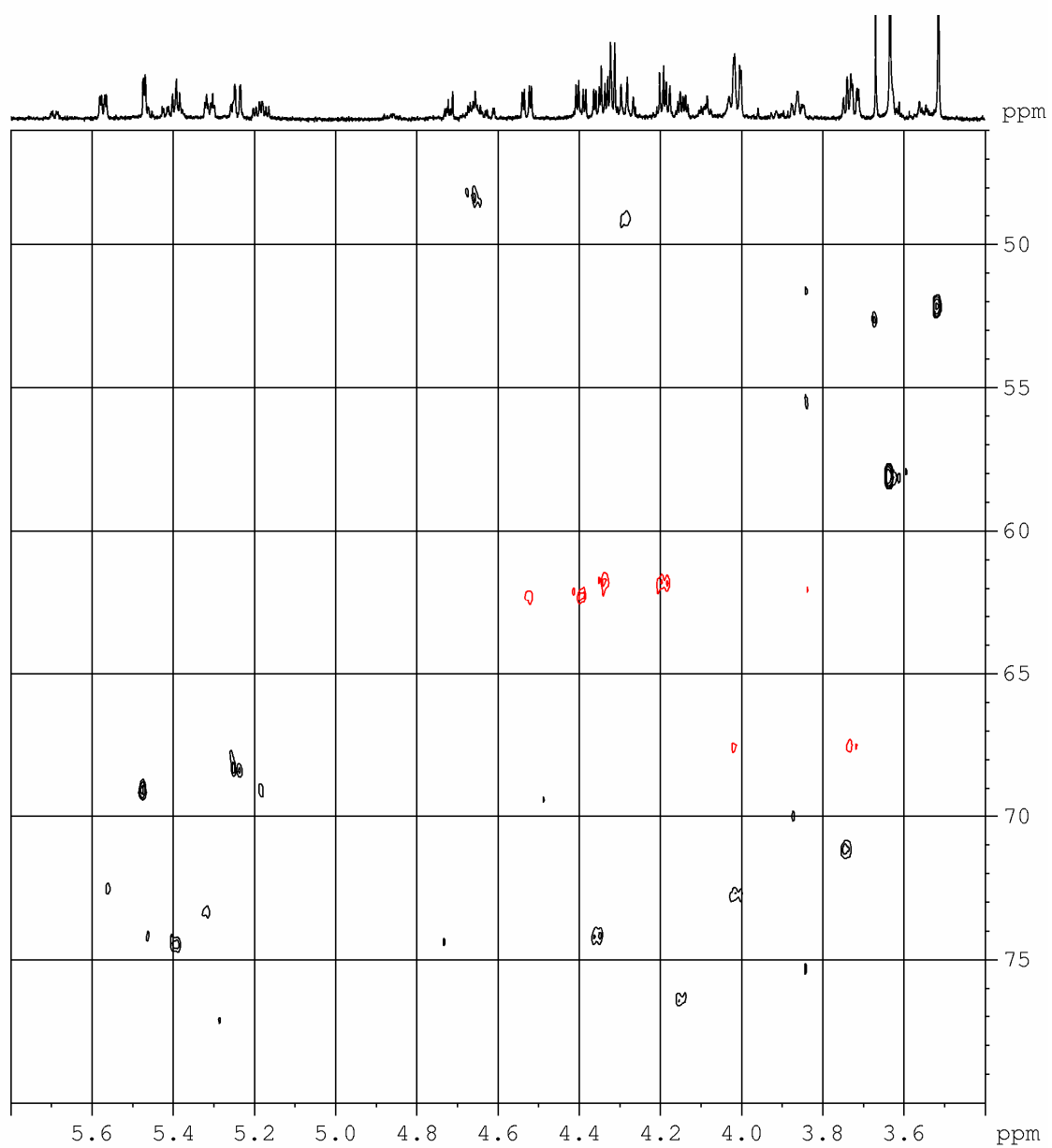
Spettro COSY del composto **6** in C_6D_6 a 700 MHz



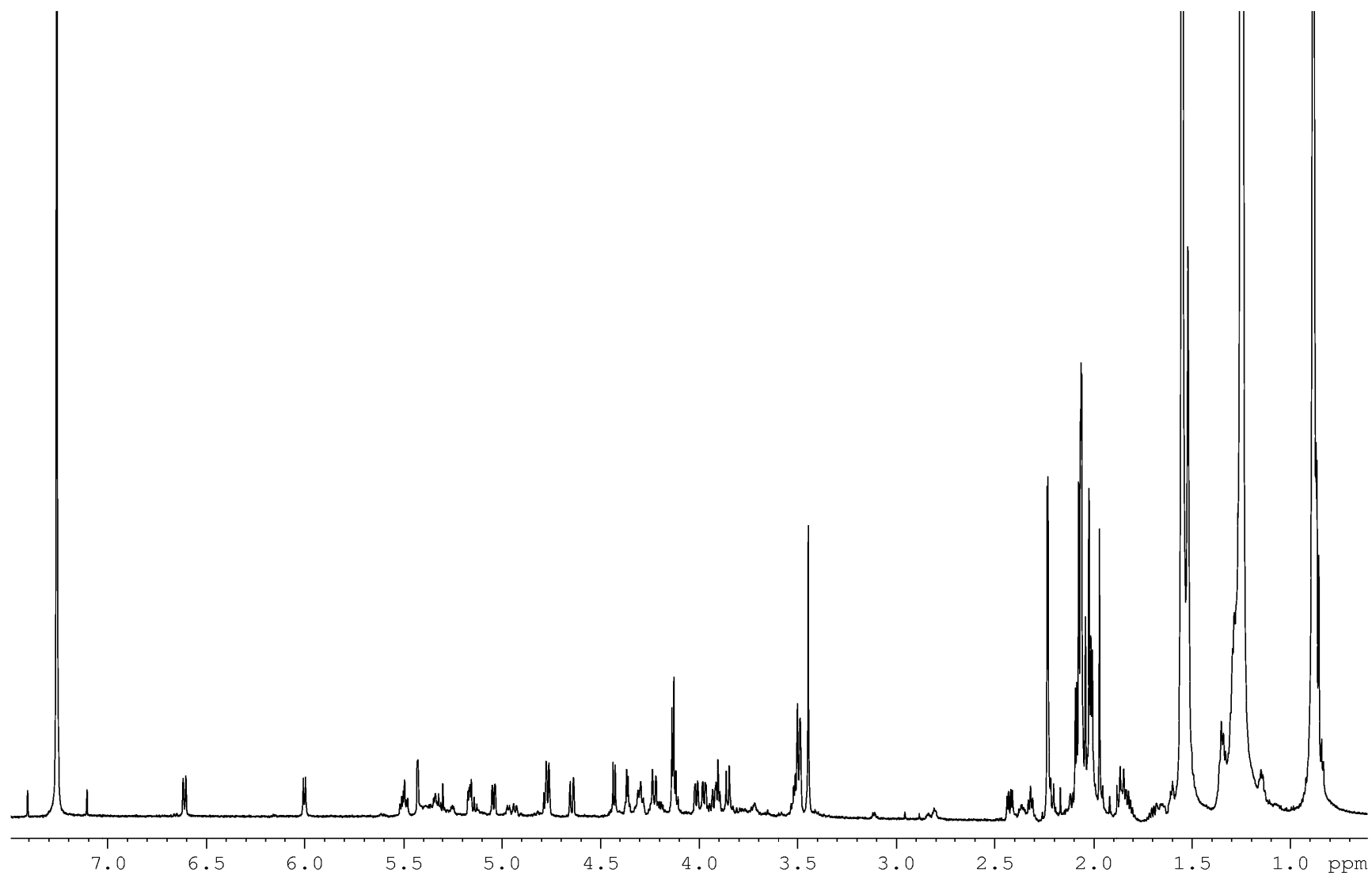
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **6** in C_6D_6 a 700 MHz



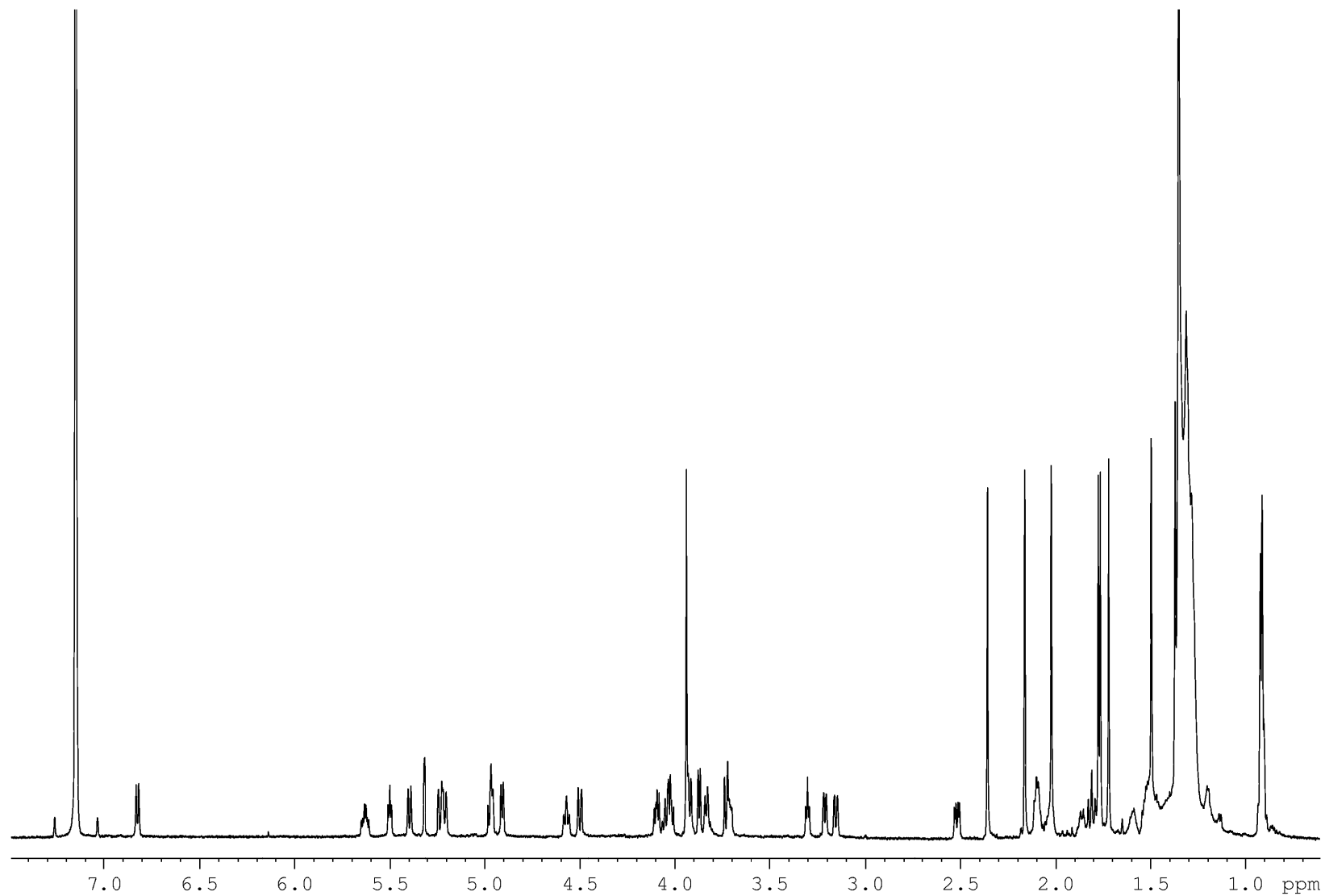
Spettro HSQC del composto **6** in C_6D_6 a 700 MHz



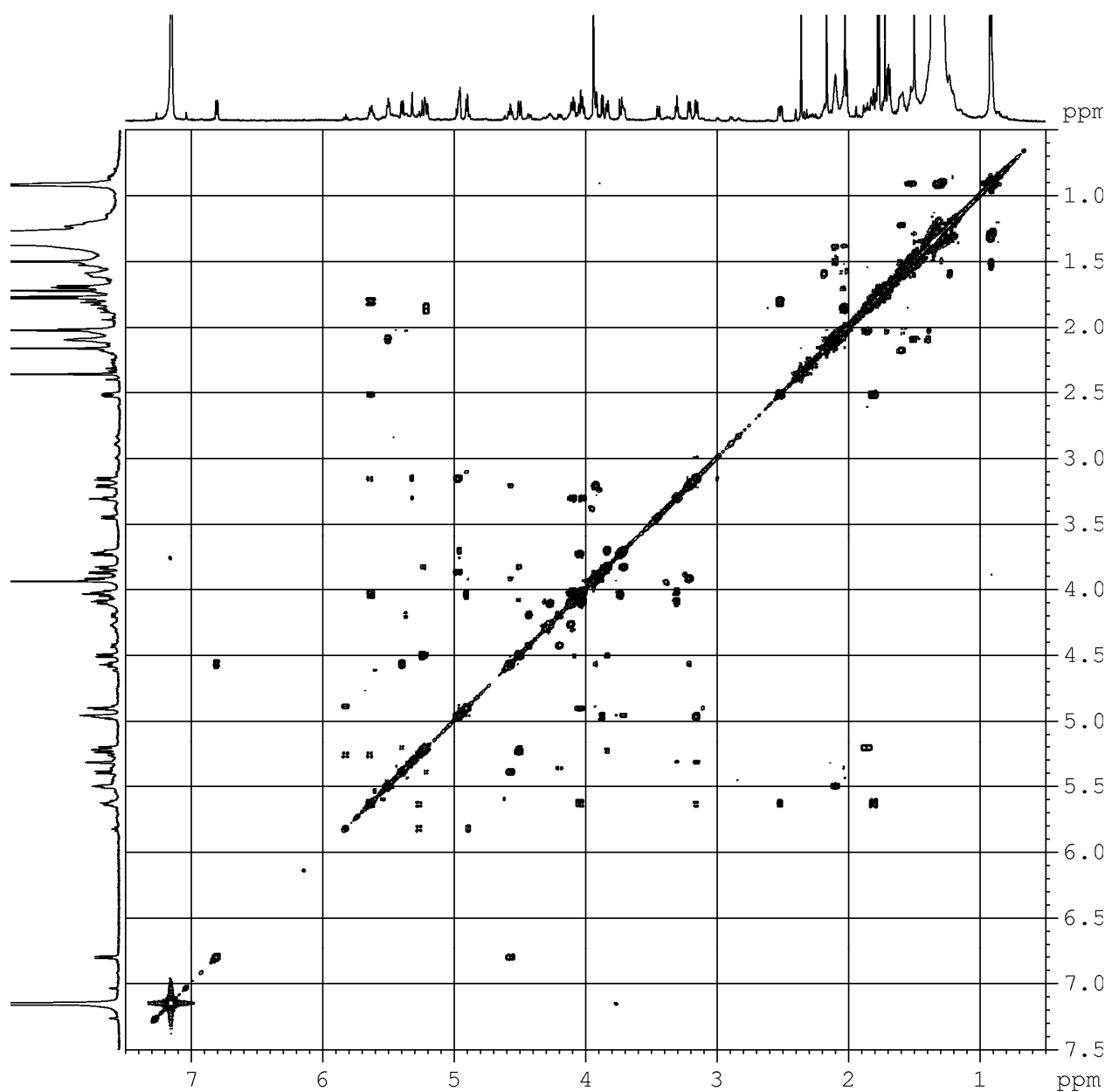
Ingrandimento dello spettro HSQC del
composto **6** in C_6D_6 a 700 MHz



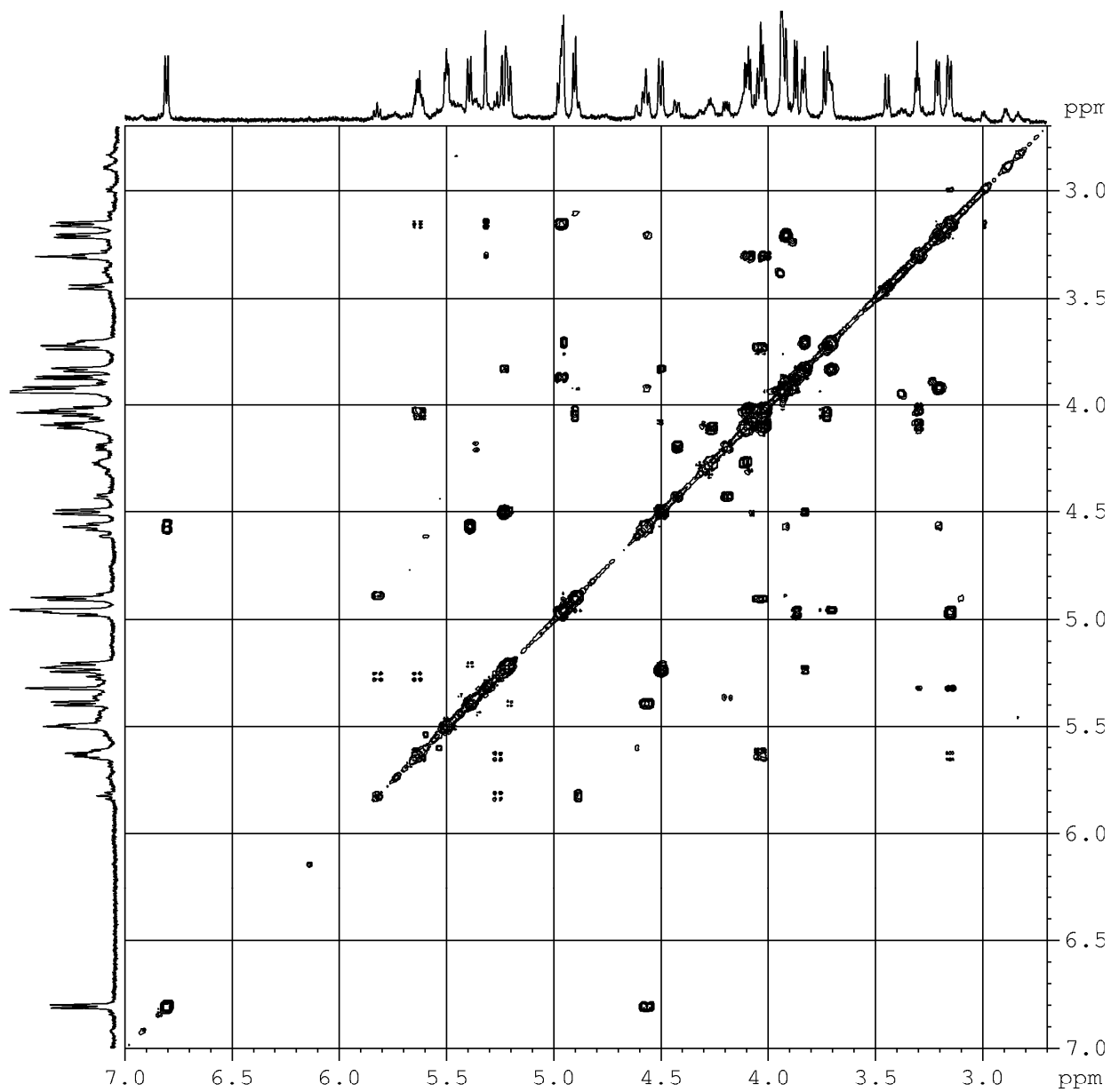
Spettro ^1H NMR del composto **7** in CDCl_3 a 500MHz



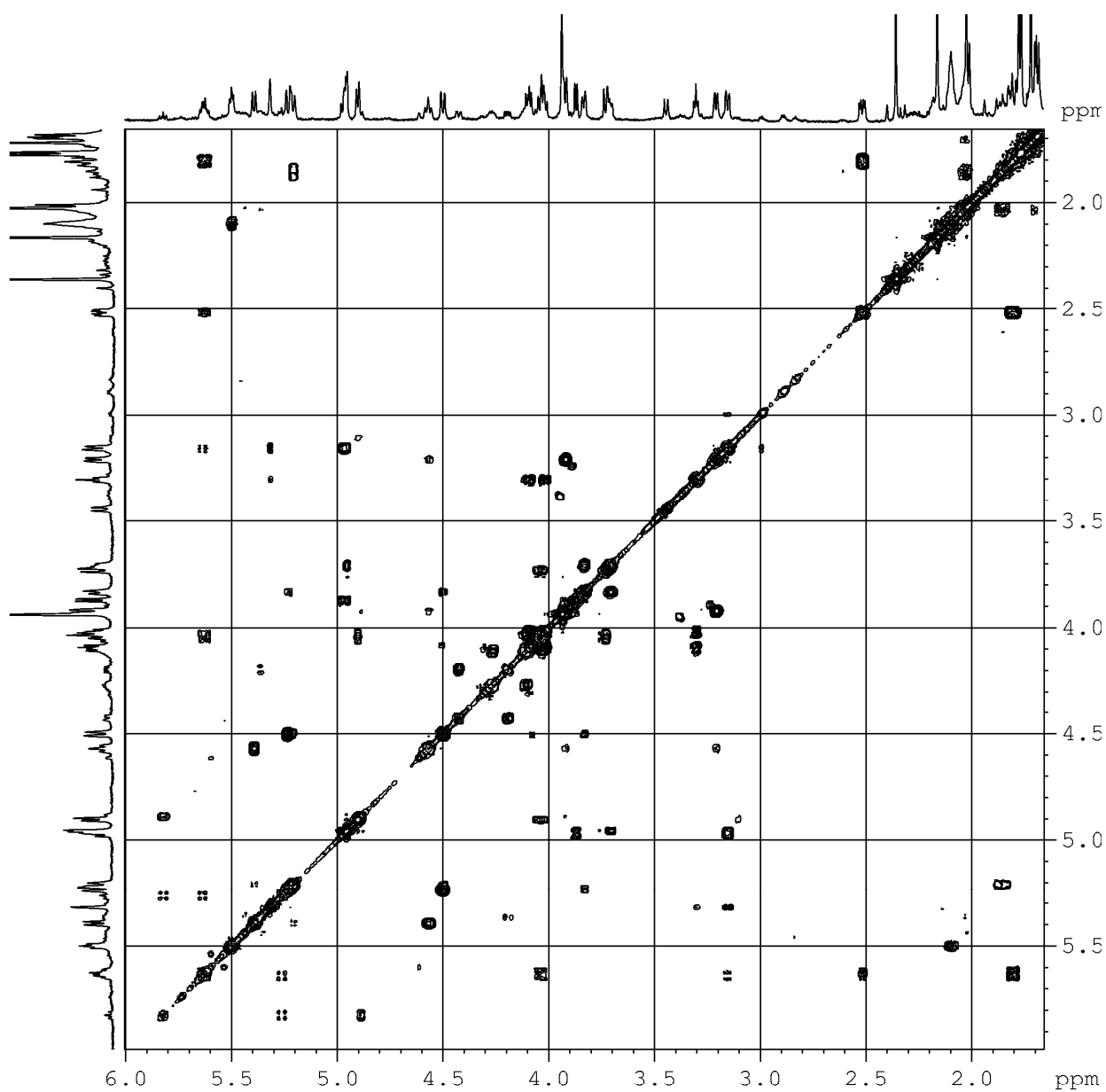
Spettro ^1H NMR del composto **7** in C_6D_6 a 500MHz



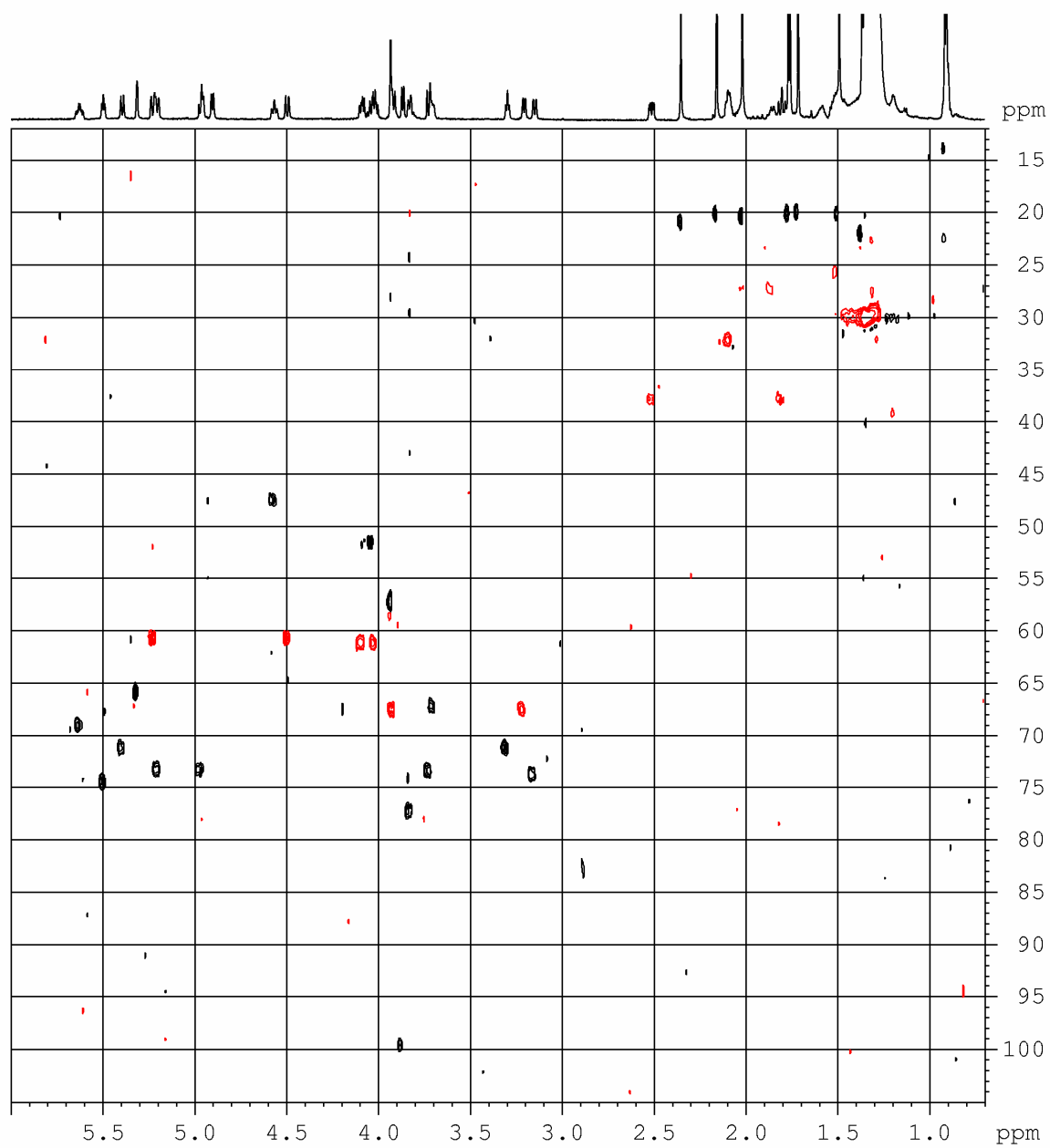
Spettro COSY del composto 7 in C_6D_6 a 500 MHz



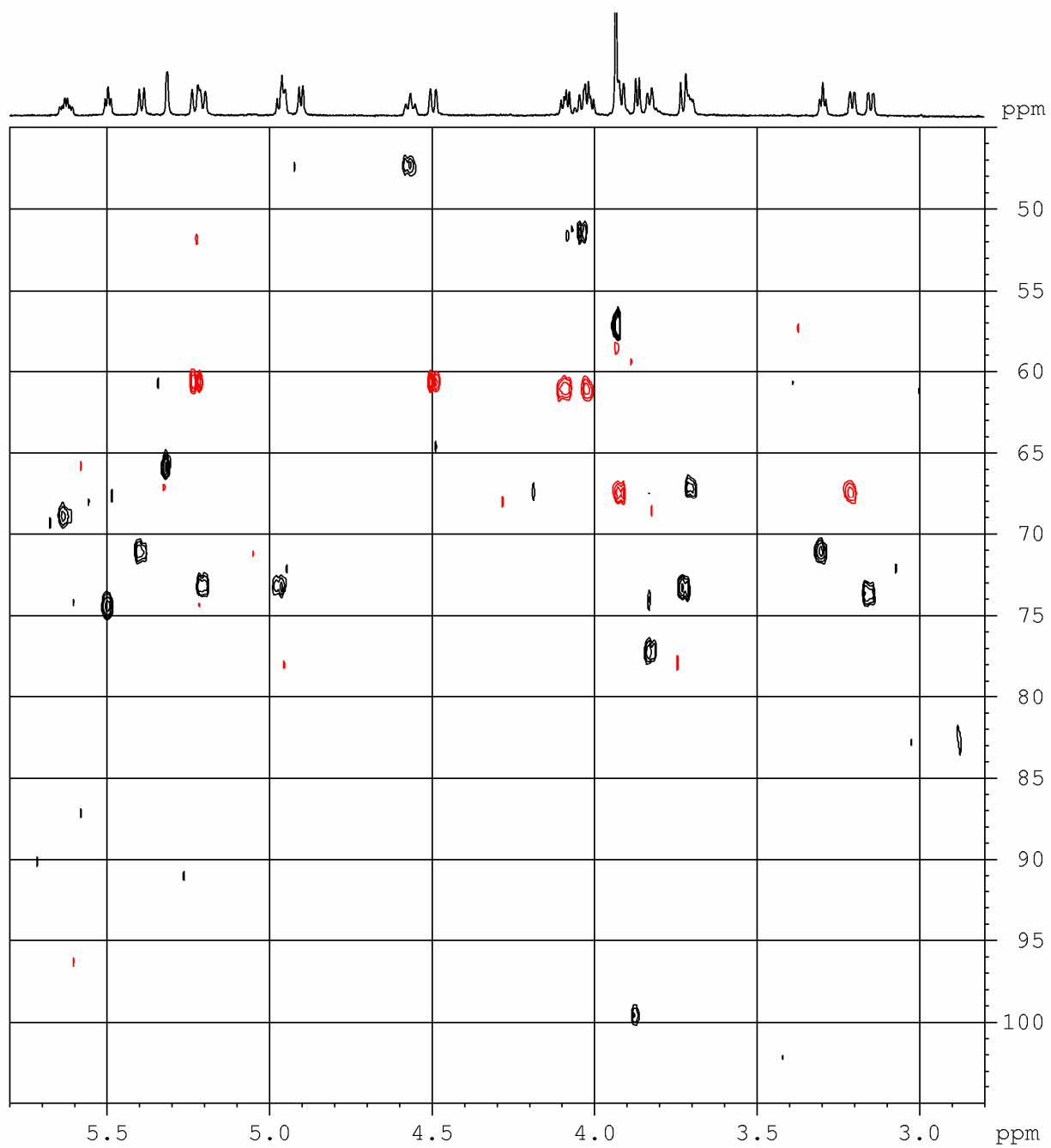
Regione a campi bassi dello spettro COSY
del composto **7** in C₆D₆ a 500 MHz



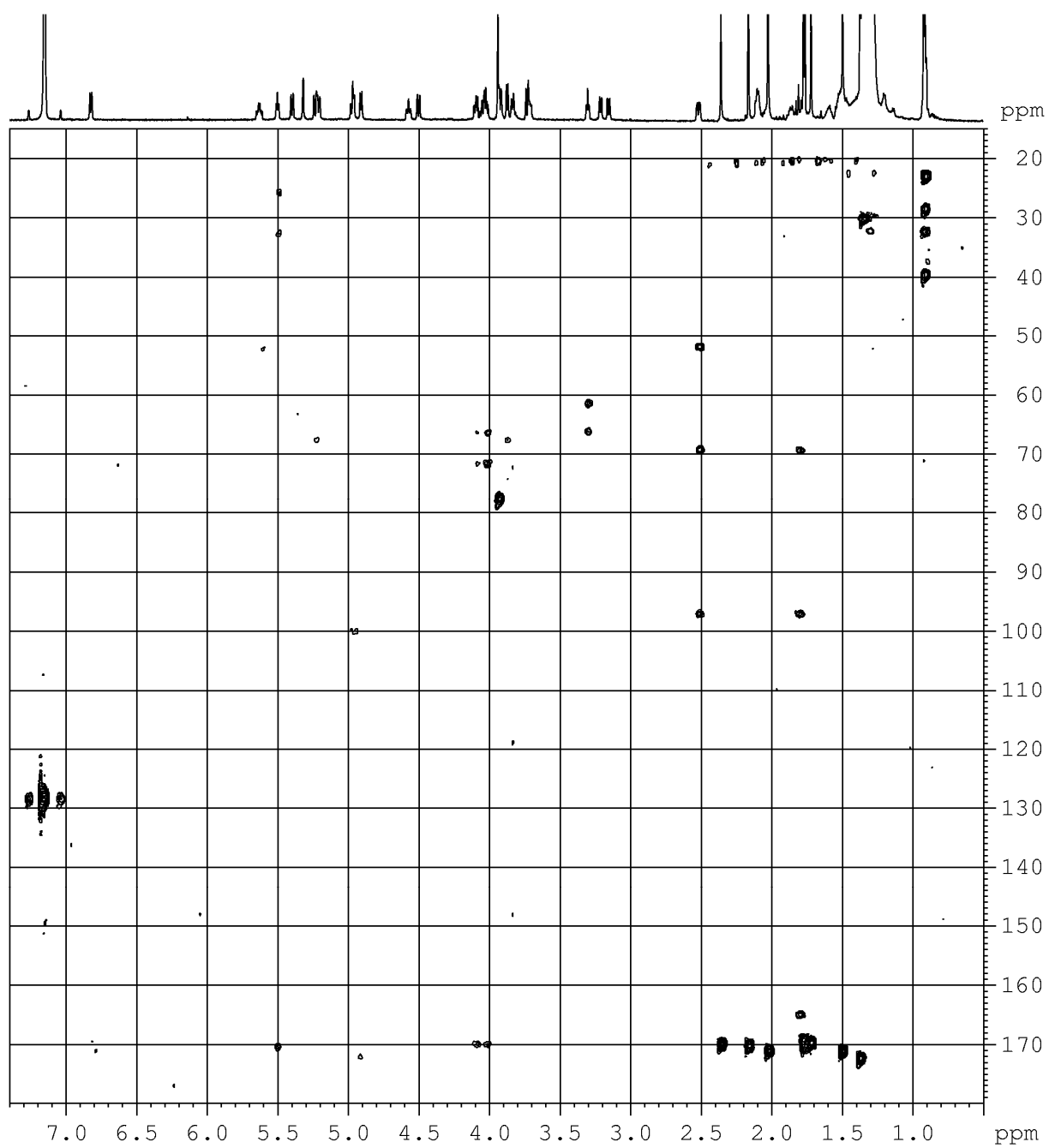
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **7** in C_6D_6 a 500 MHz



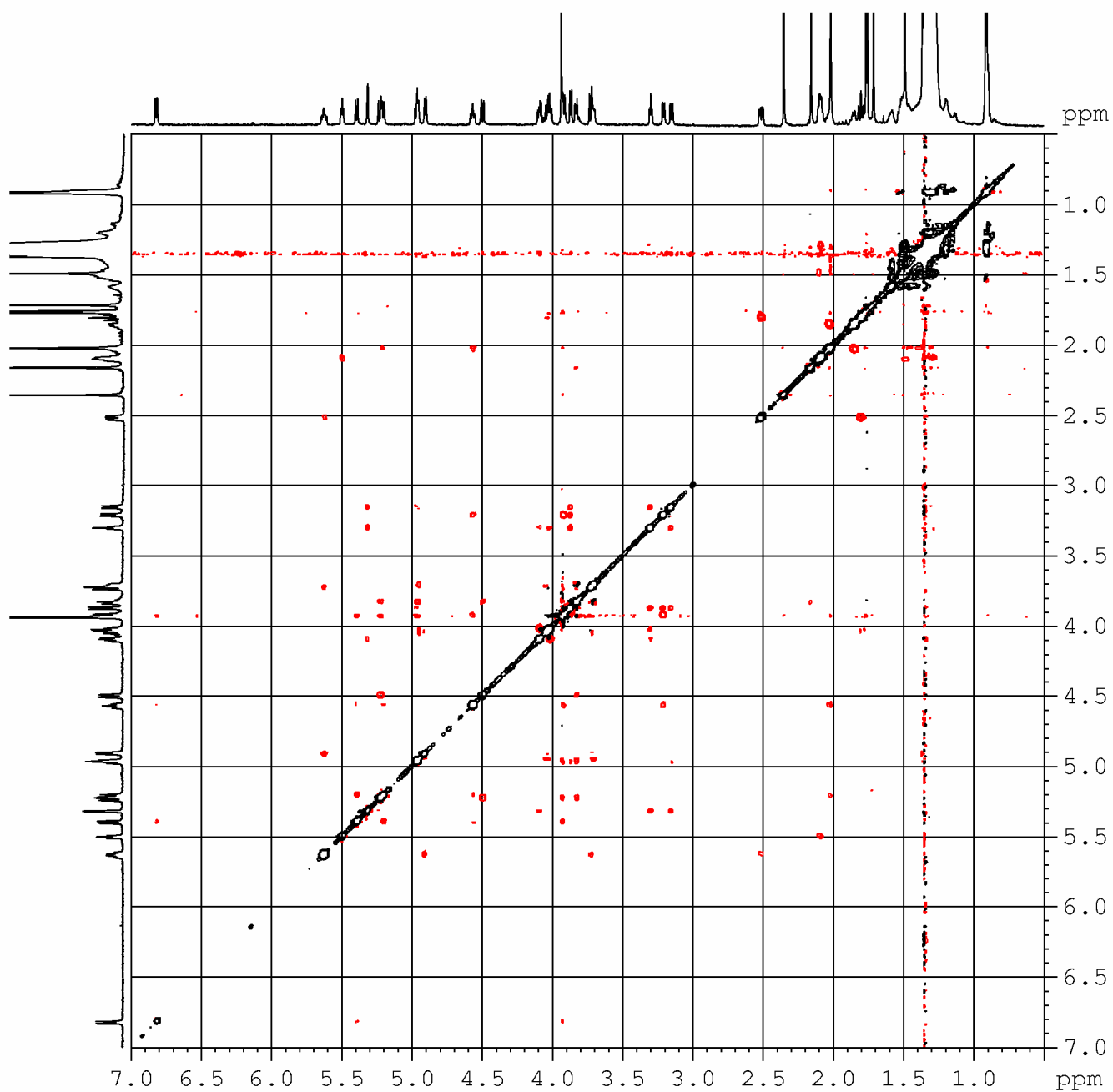
Spettro HSQC del composto **7** in C_6D_6 a 500 MHz



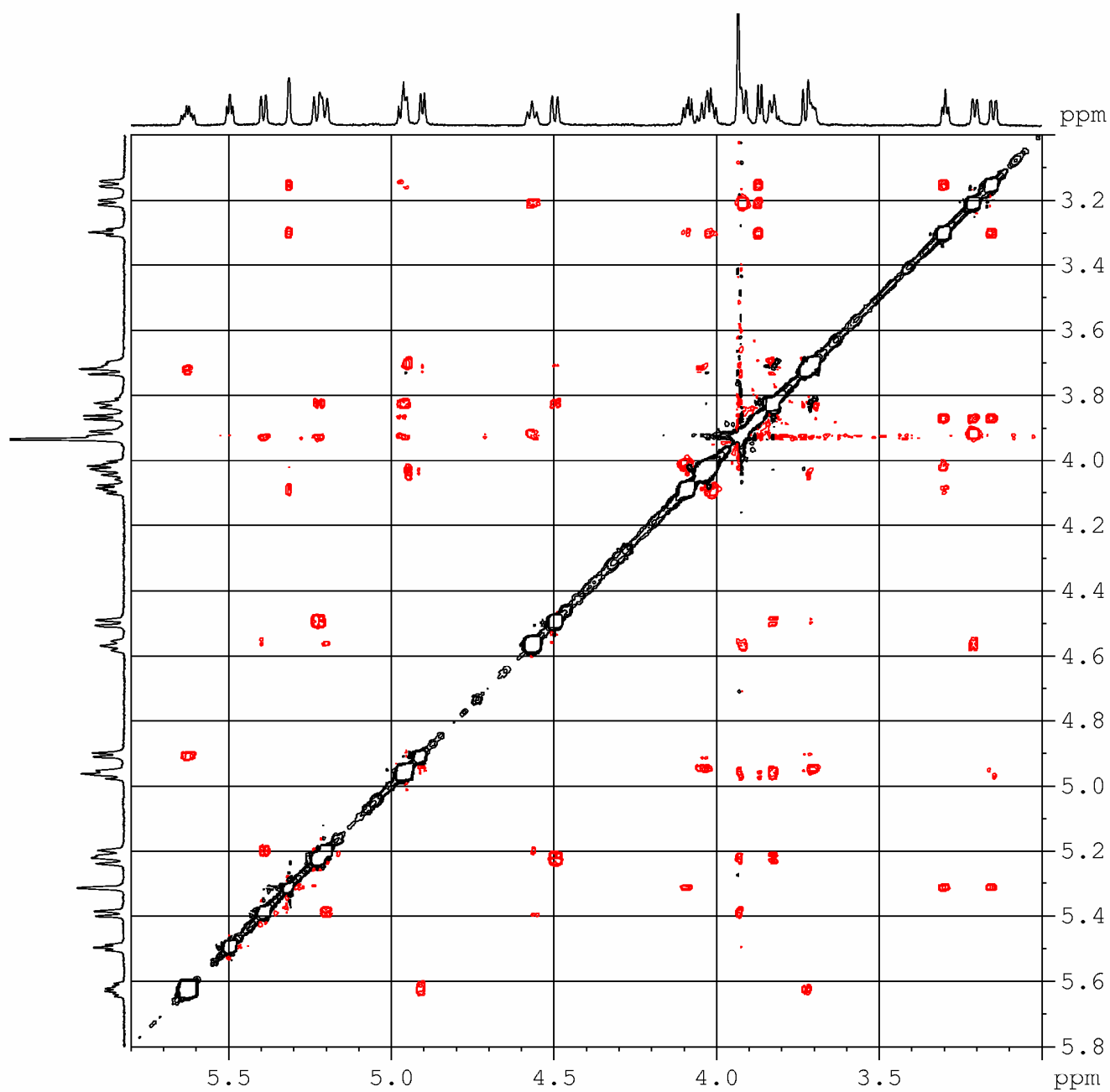
Regione a campi medi dello spettro HSQC
del composto 7 in C_6D_6 a 500 MHz



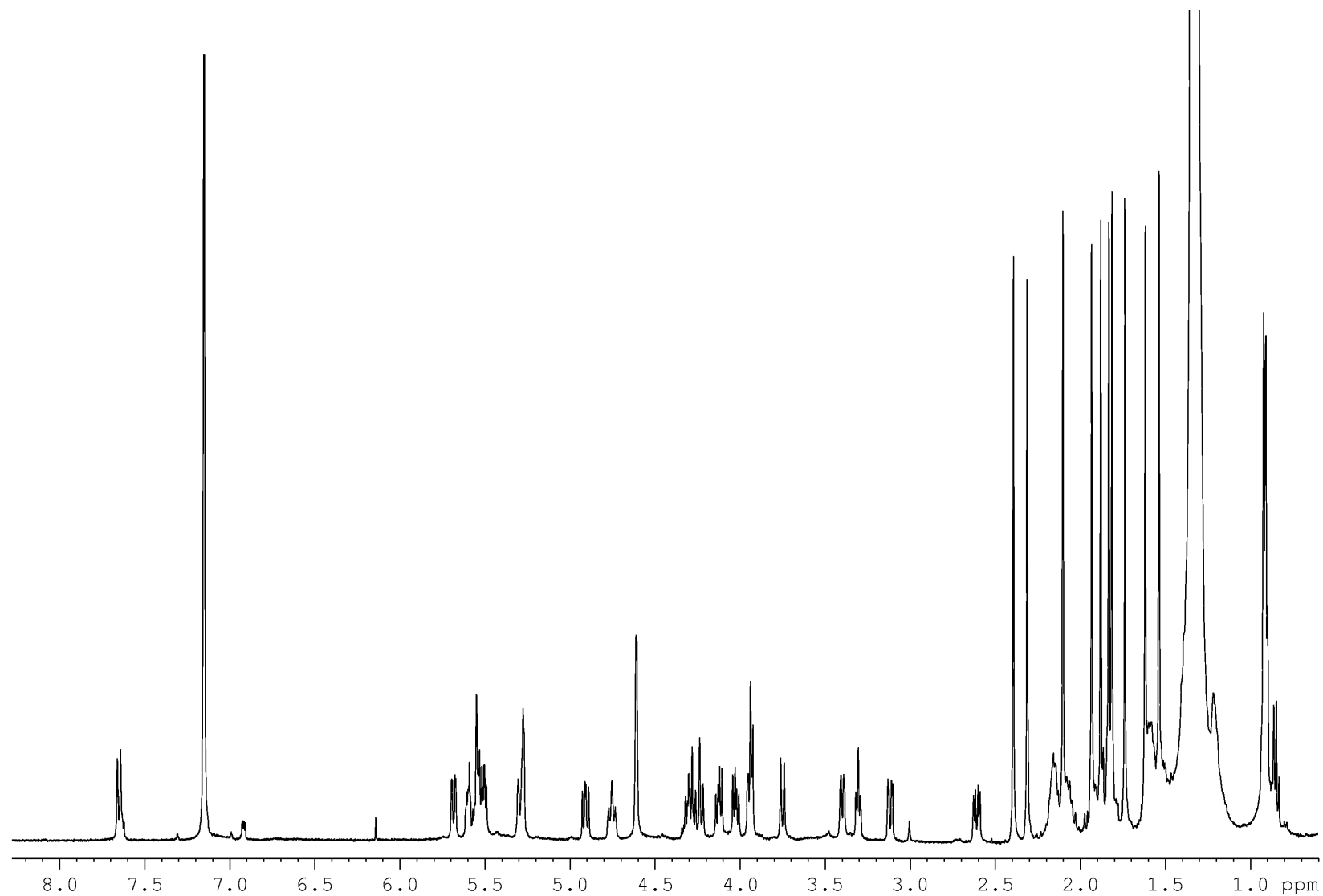
Spettro HMBC del composto **7** in C_6D_6 a 500 MHz



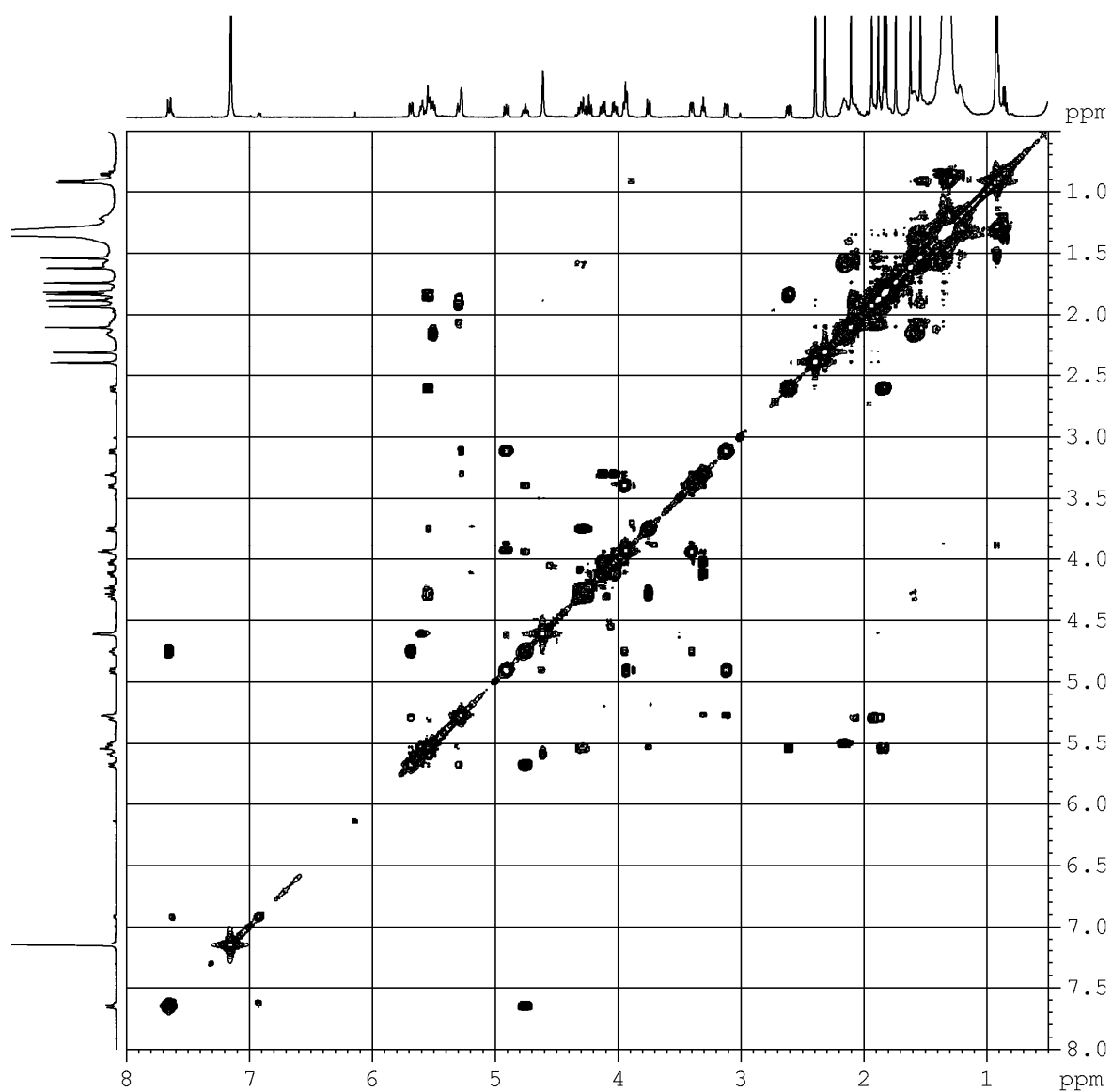
Spettro ROESY del composto **7** in C_6D_6 a 500 MHz



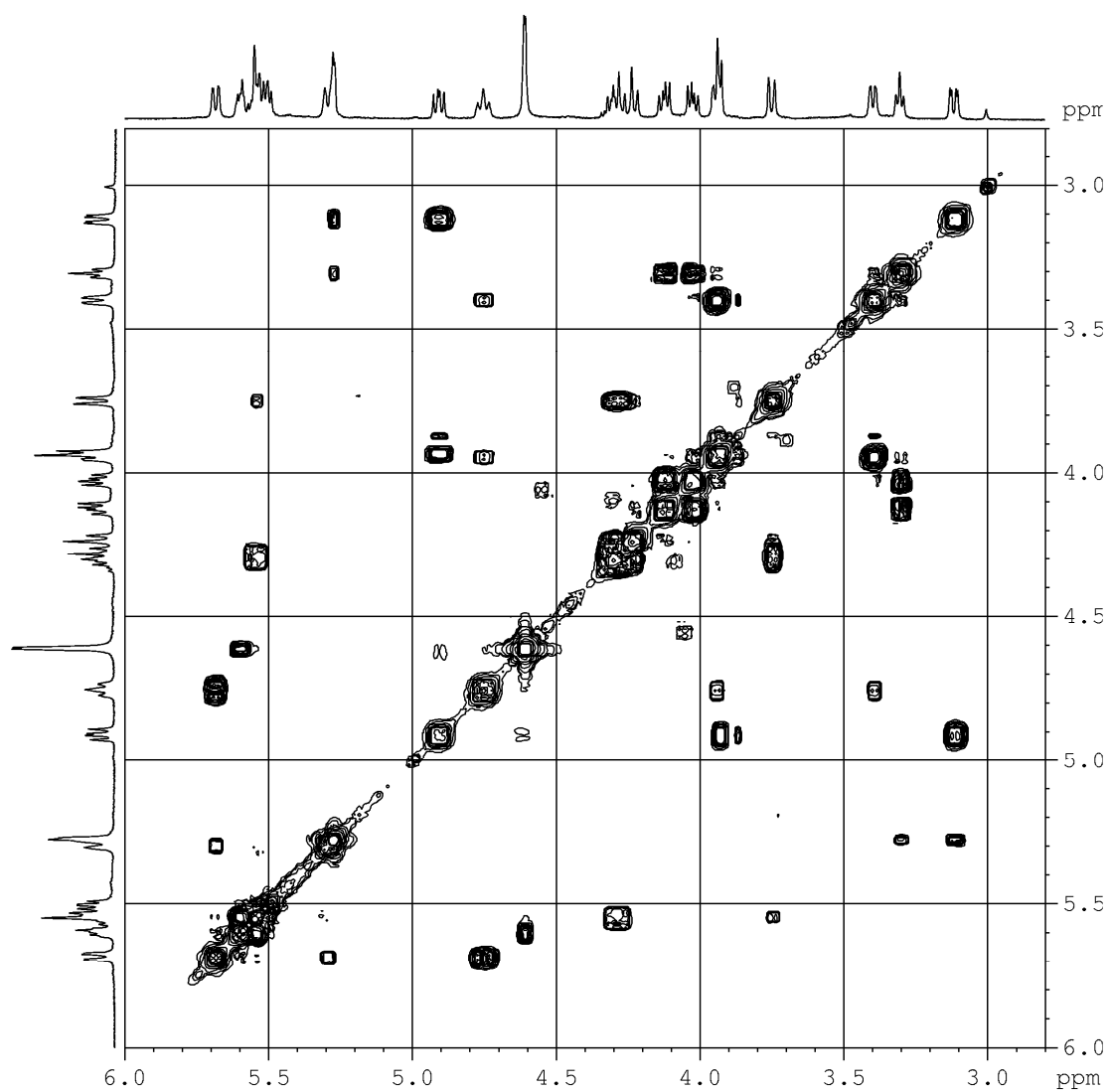
Regione a campi medi dello spettro ROESY
del composto **7** in C₆D₆ a 500 MHz



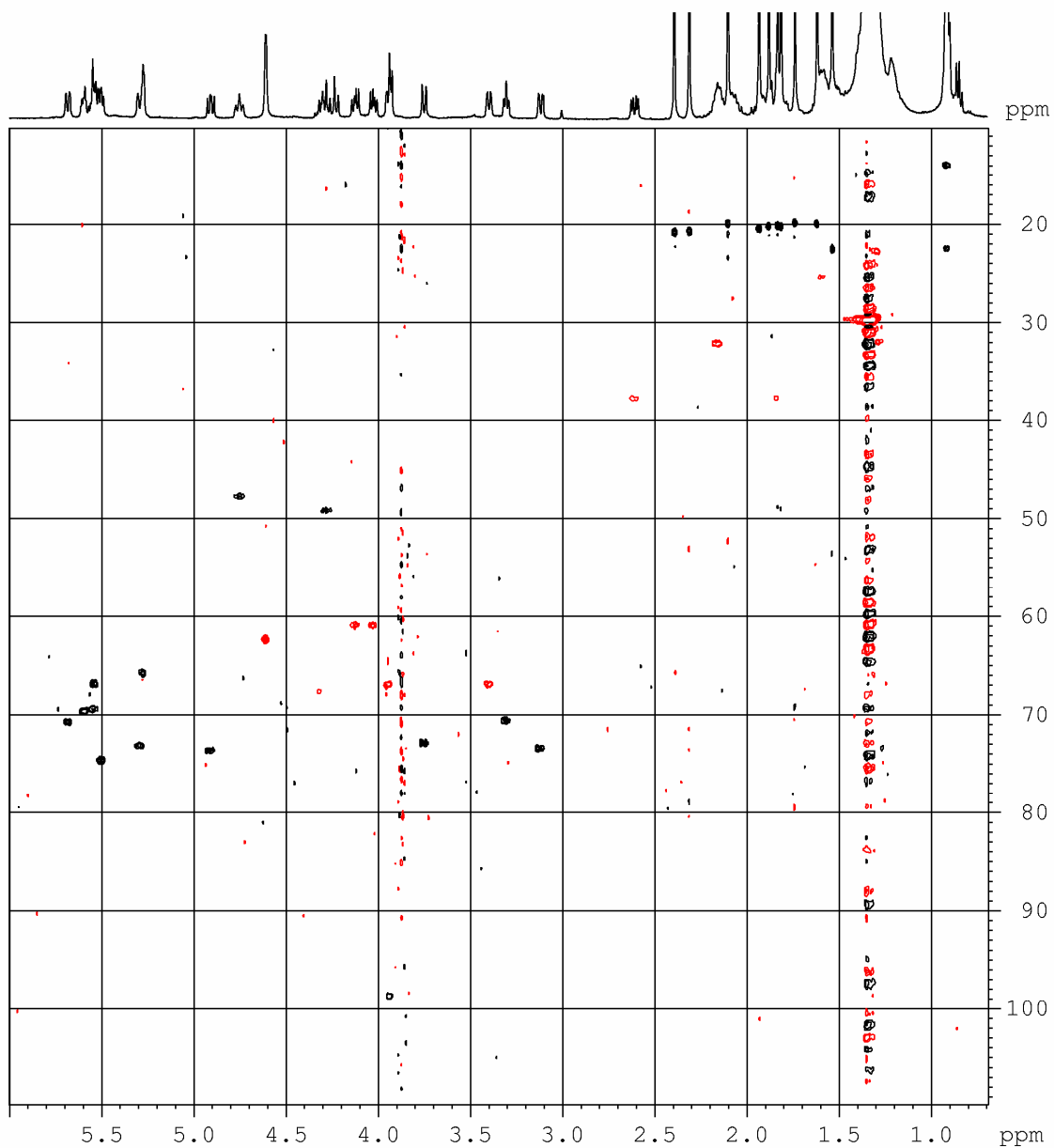
Spettro ^1H -NMR del composto **8** in C_6D_6 a 500 MHz



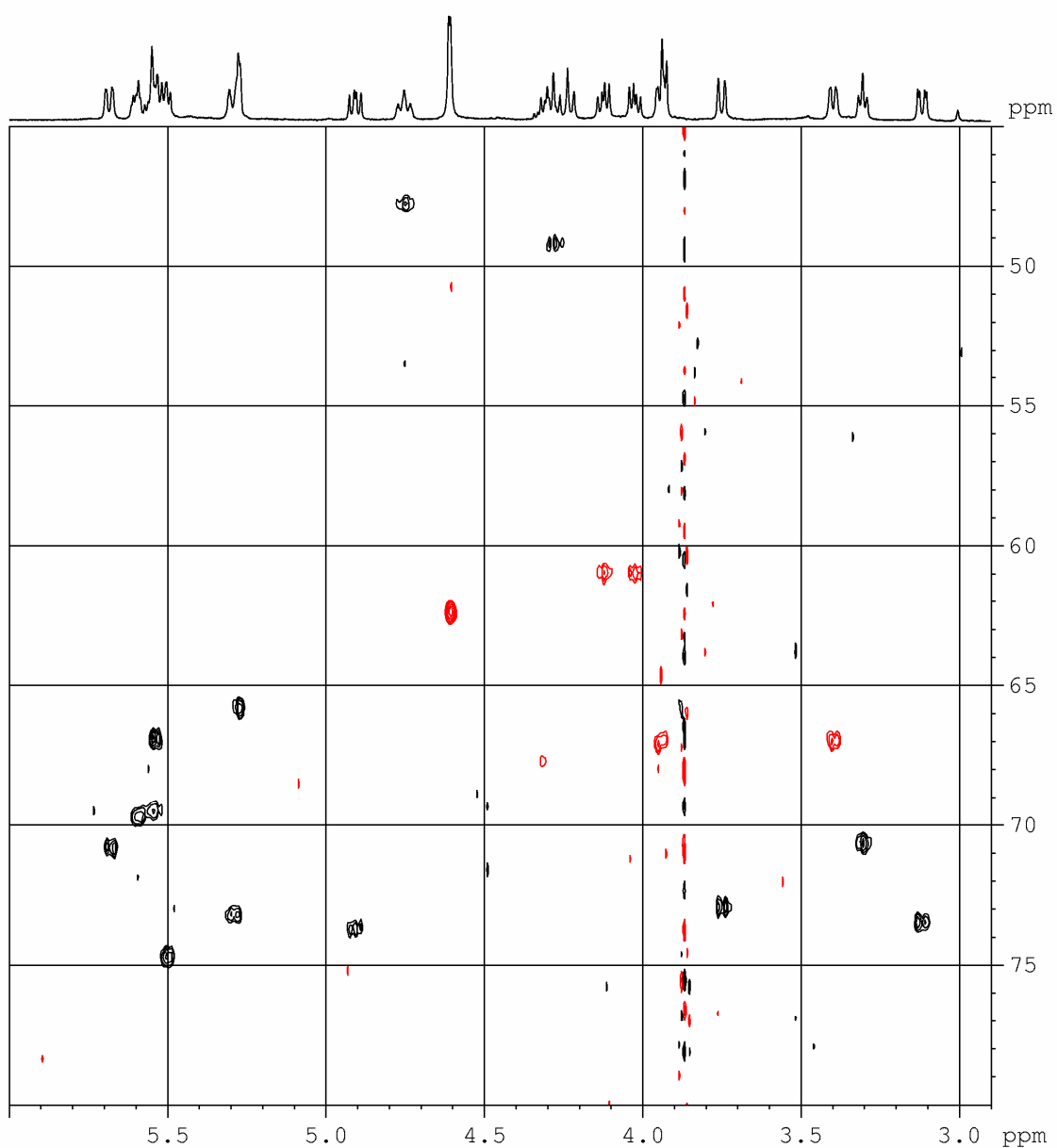
Spettro COSY del composto **8** in C_6D_6 a 500 MHz



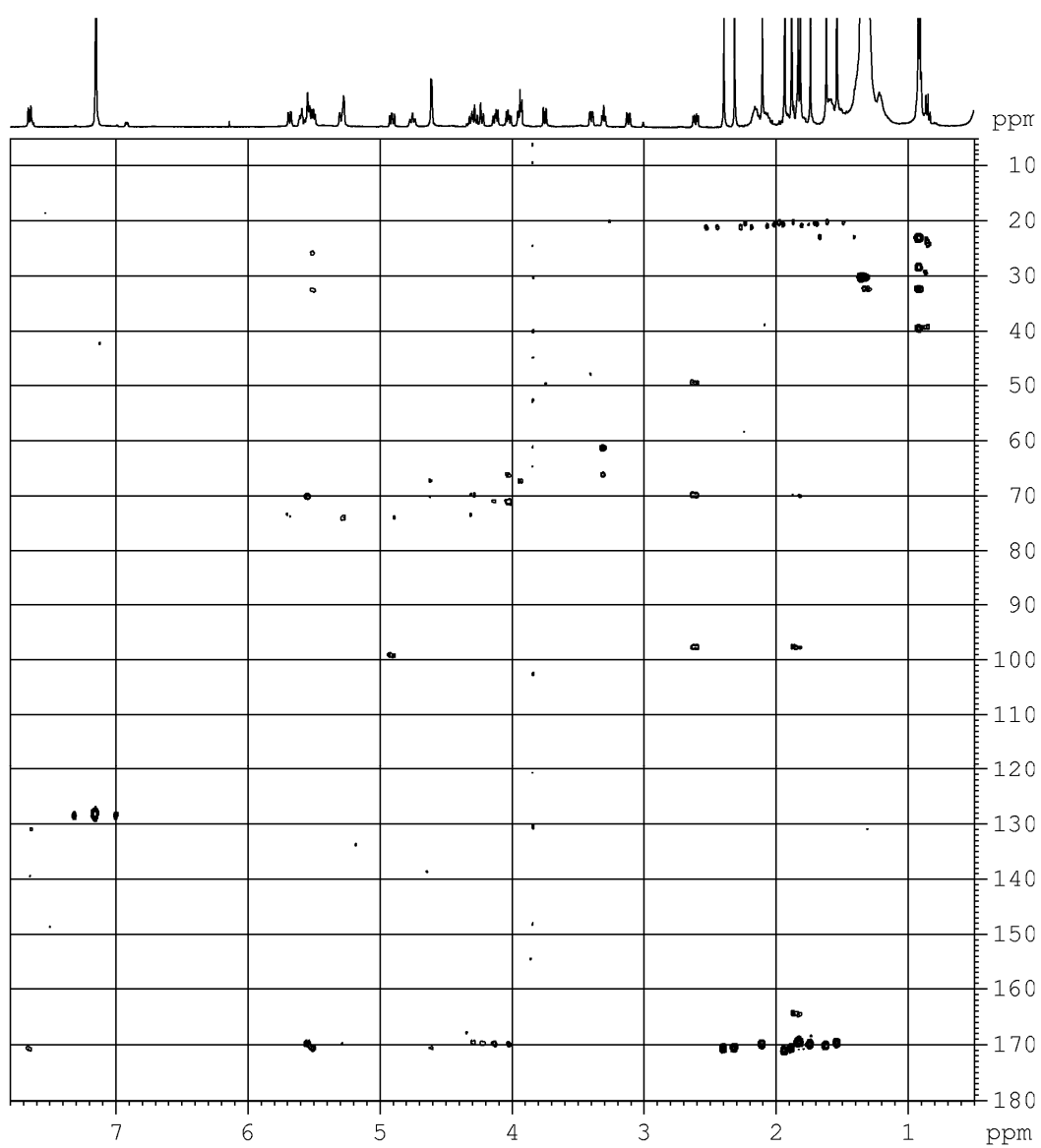
Regione a campi medi dello spettro COSY
del composto **8** in C_6D_6 a 500 MHz



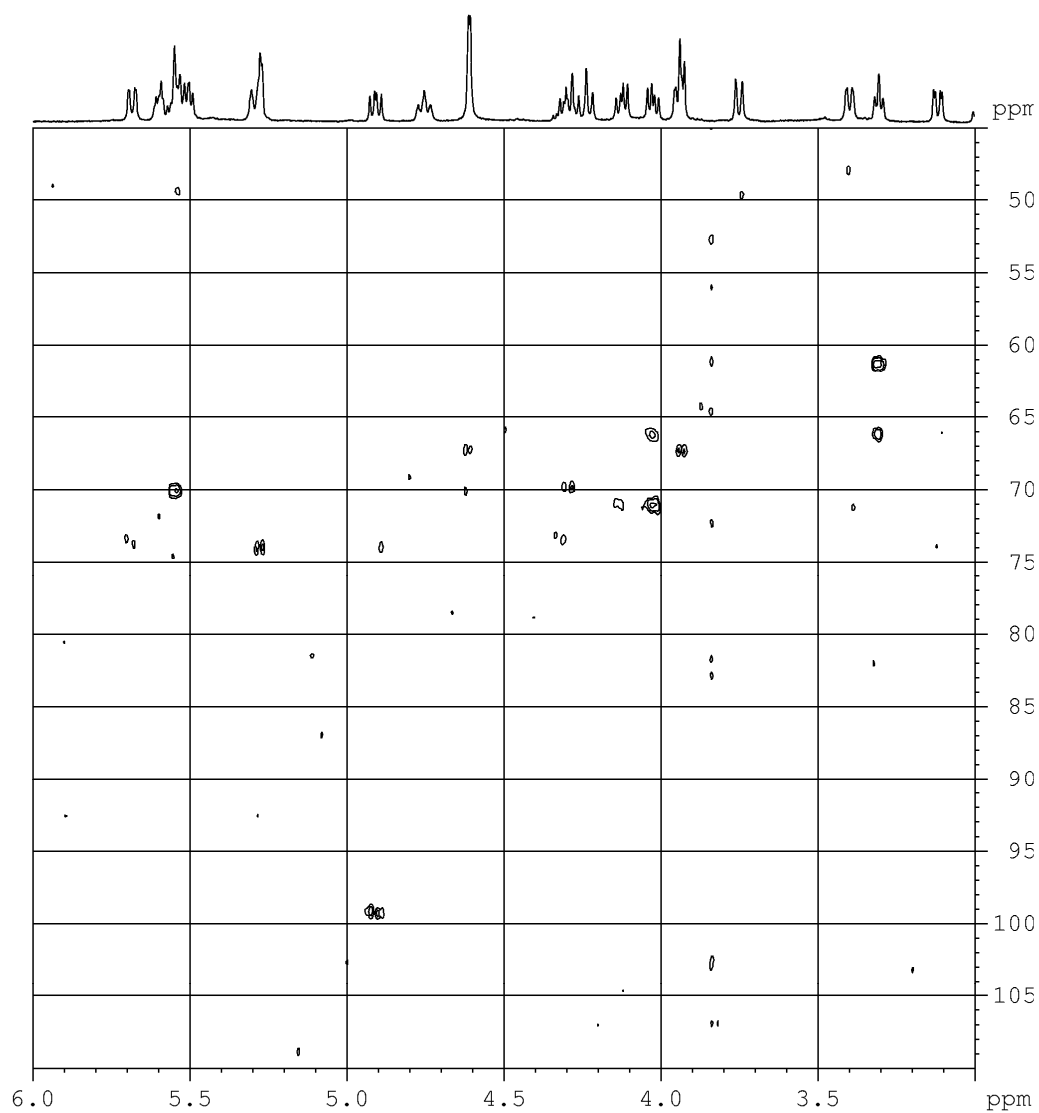
Spettro HSQC del composto **8** in C_6D_6 a 500 MHz



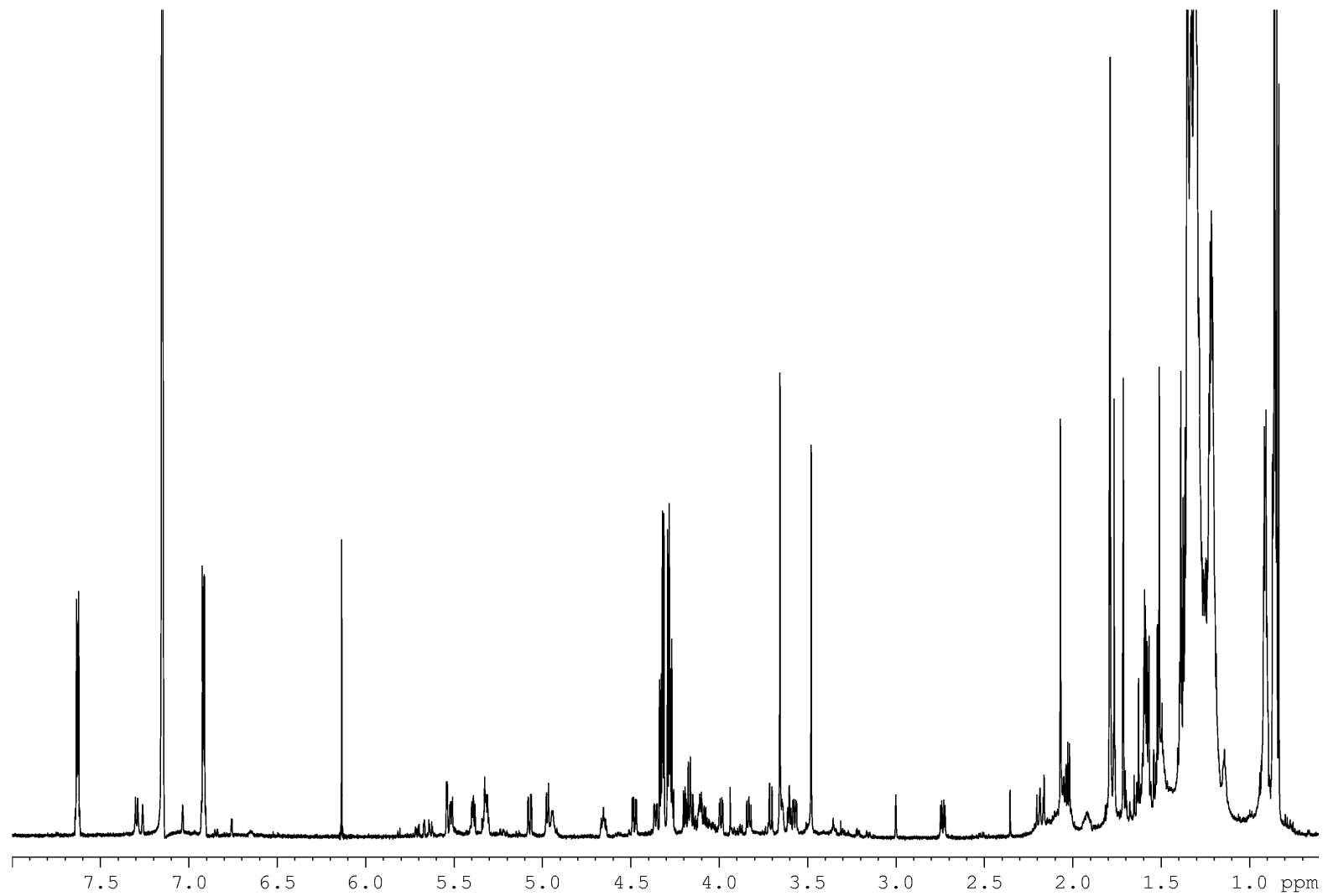
Regione a campi medi dello spettro HSQC
del composto **8** in C_6D_6 a 500 MHz



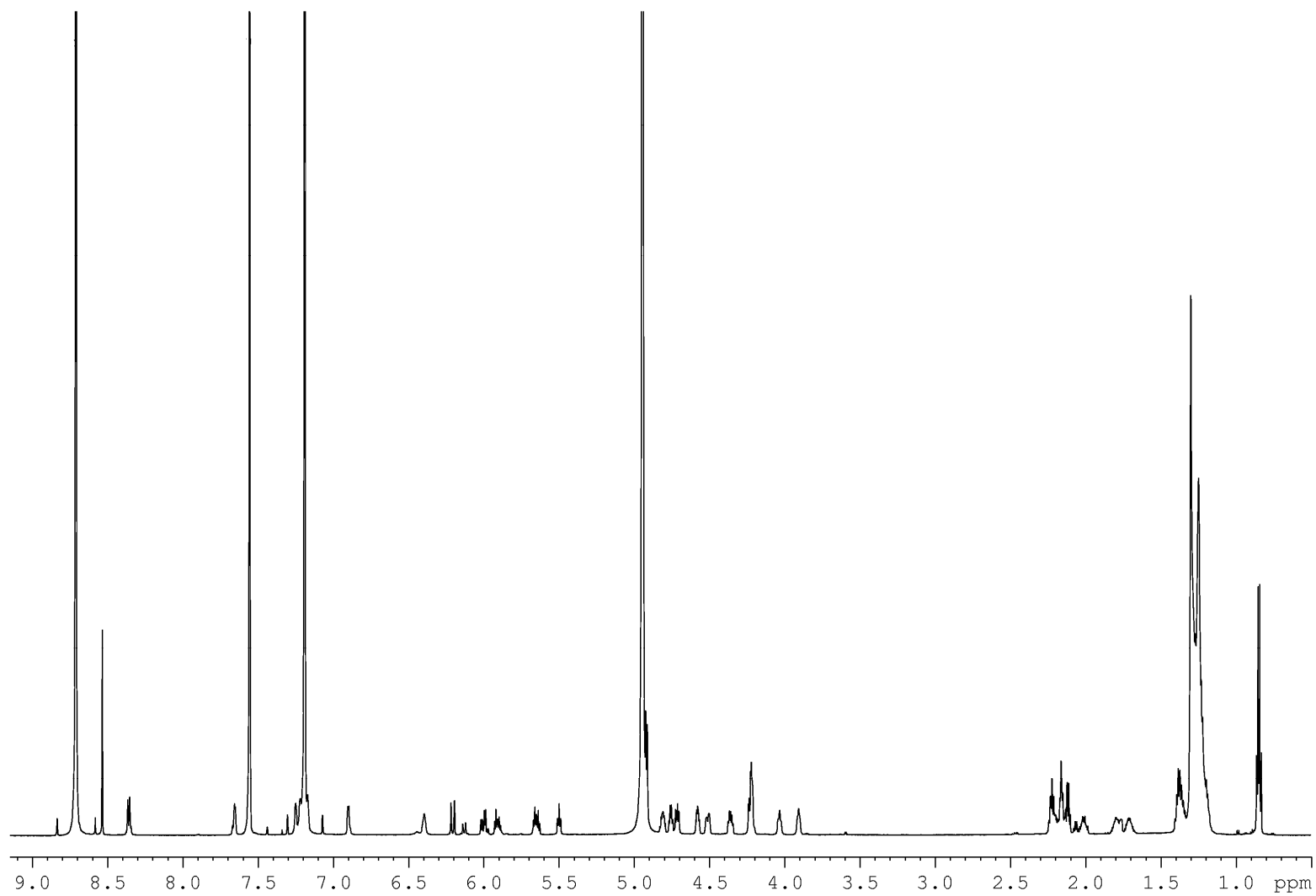
Spettro HMBC del composto **8** in C_6D_6 a 500 MHz



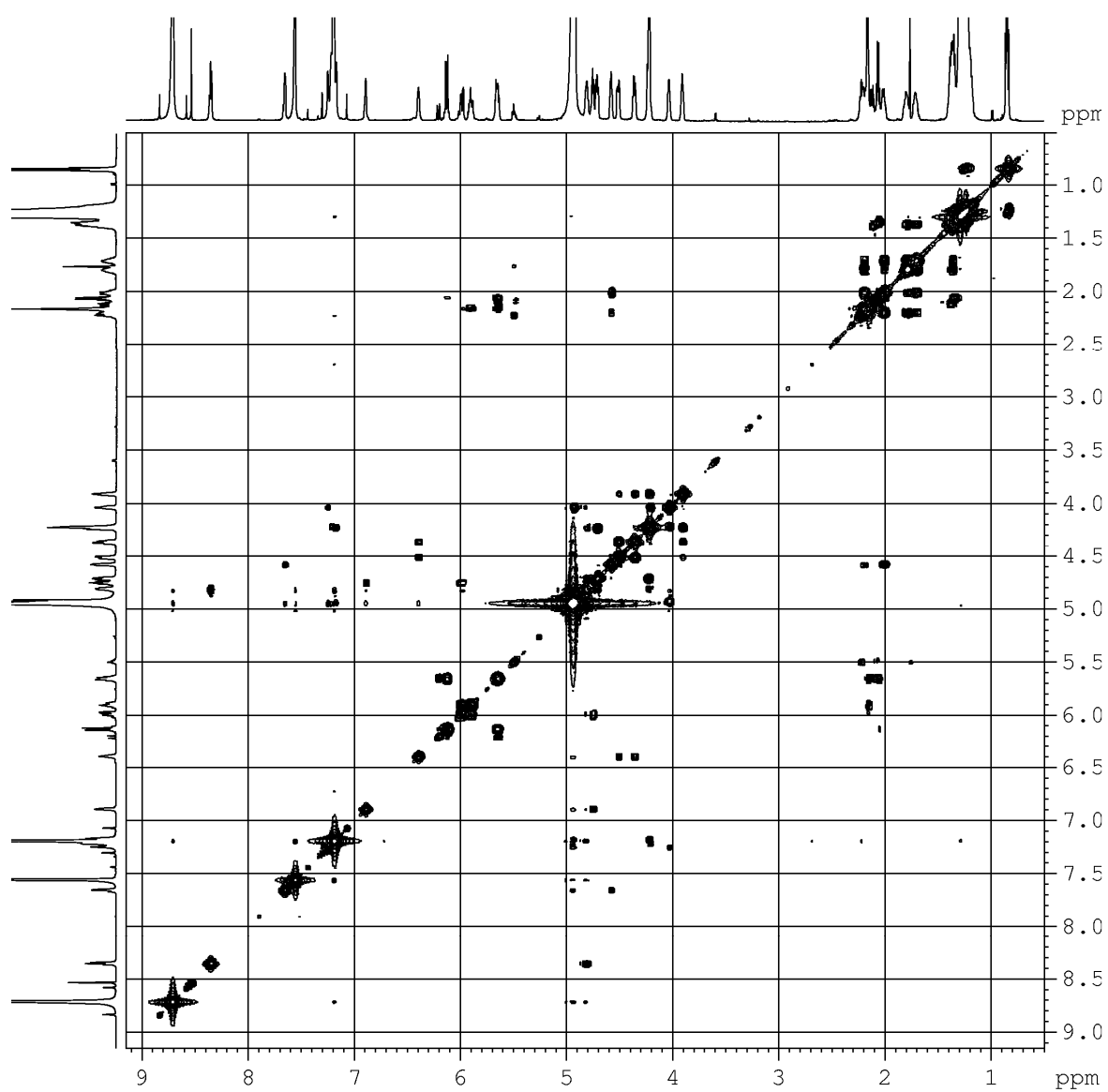
Regione a campi medi dello spettro HMBC
del composto **8** in C₆D₆ a 500 MHz



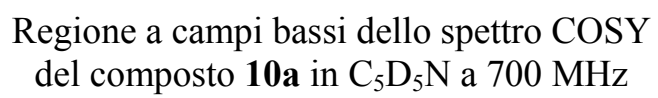
Spettro ^1H -NMR del composto **9** in C_6D_6 a 700 MHz



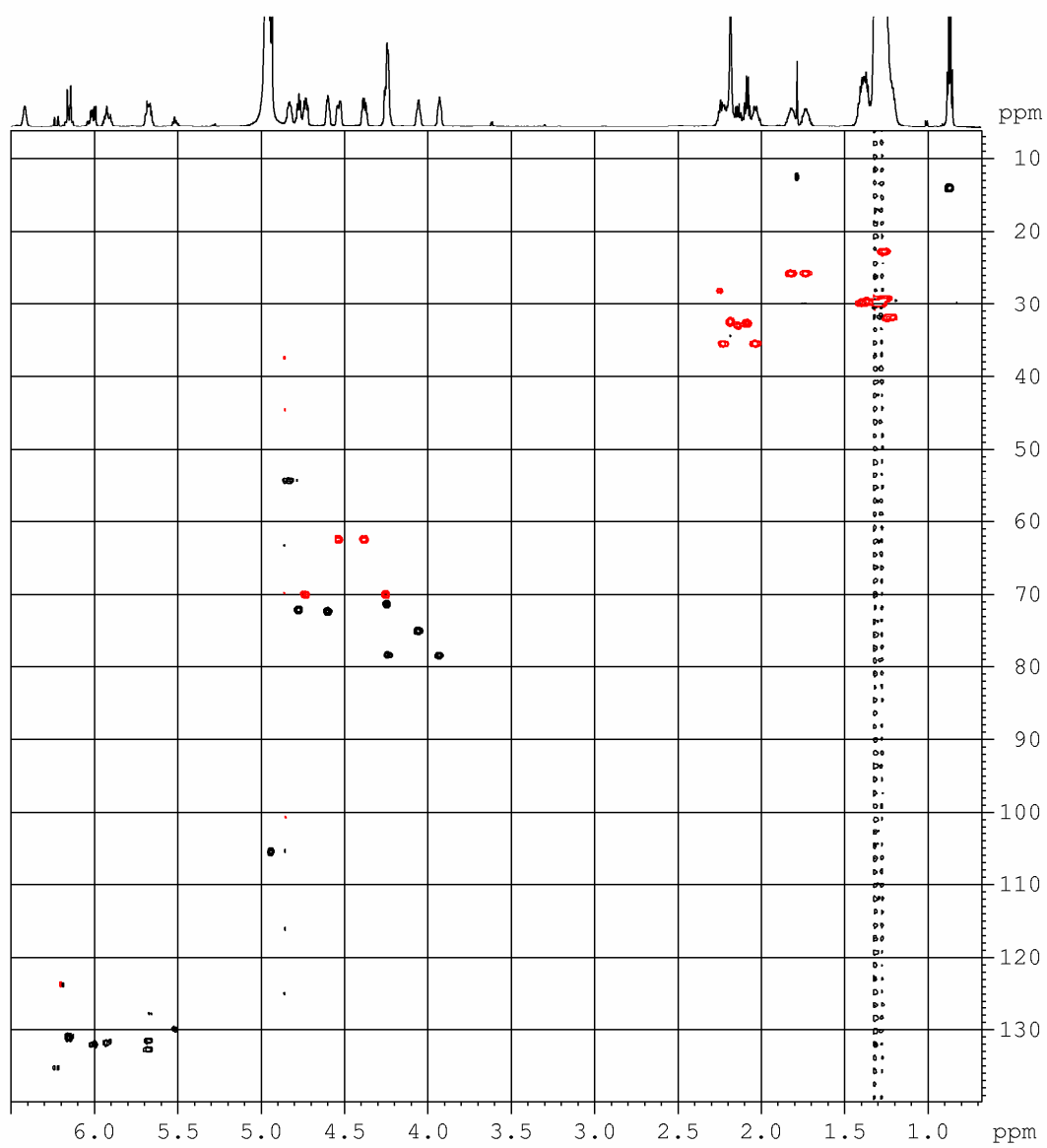
Spettro ^1H -NMR del composto **10a** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 700 MHz



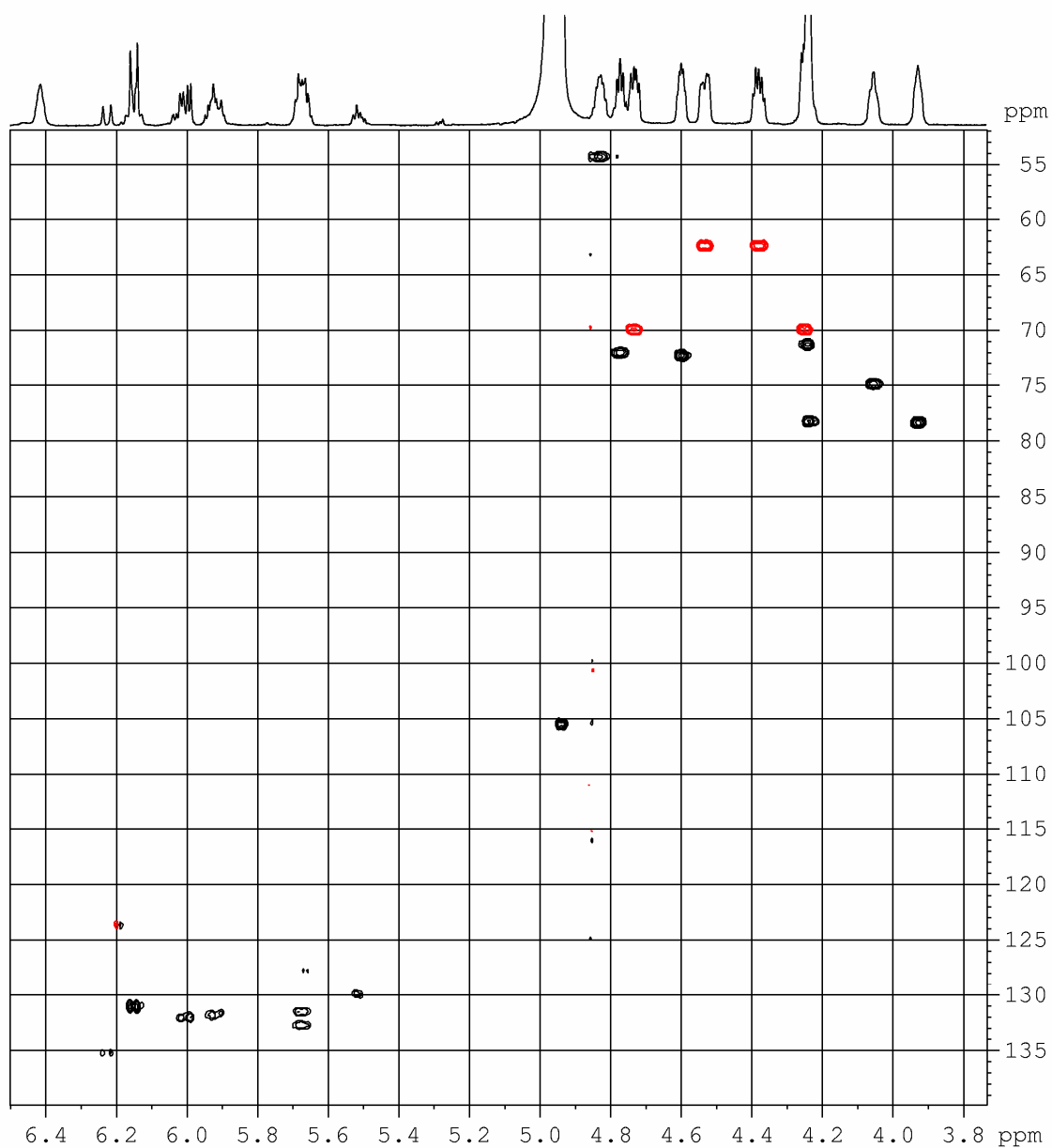
Spettro COSY del composto **10a** in C_5D_5N a 700 MHz



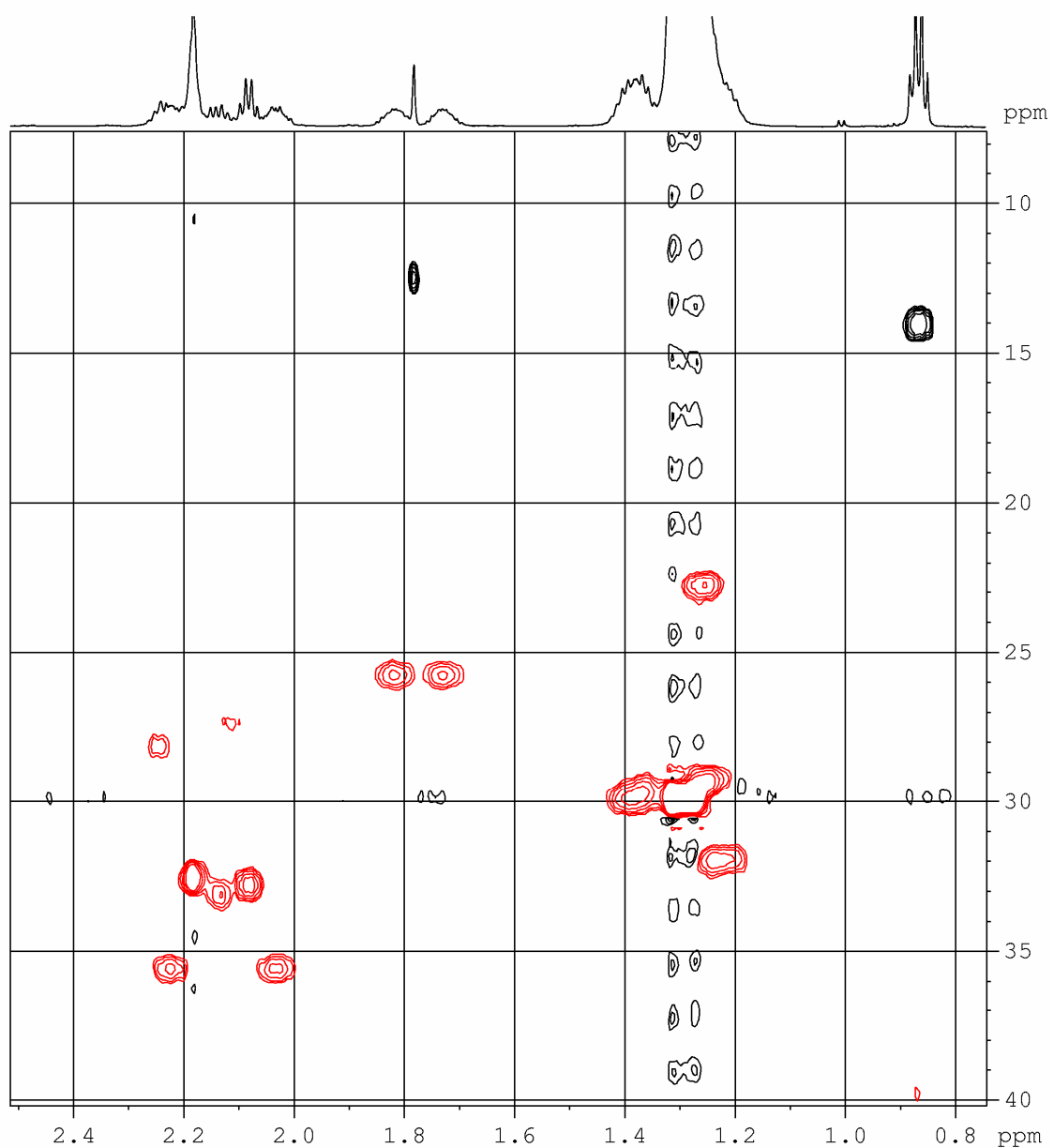
Regione a campi bassi dello spettro COSY
del composto **10a** in C₅D₅N a 700 MHz



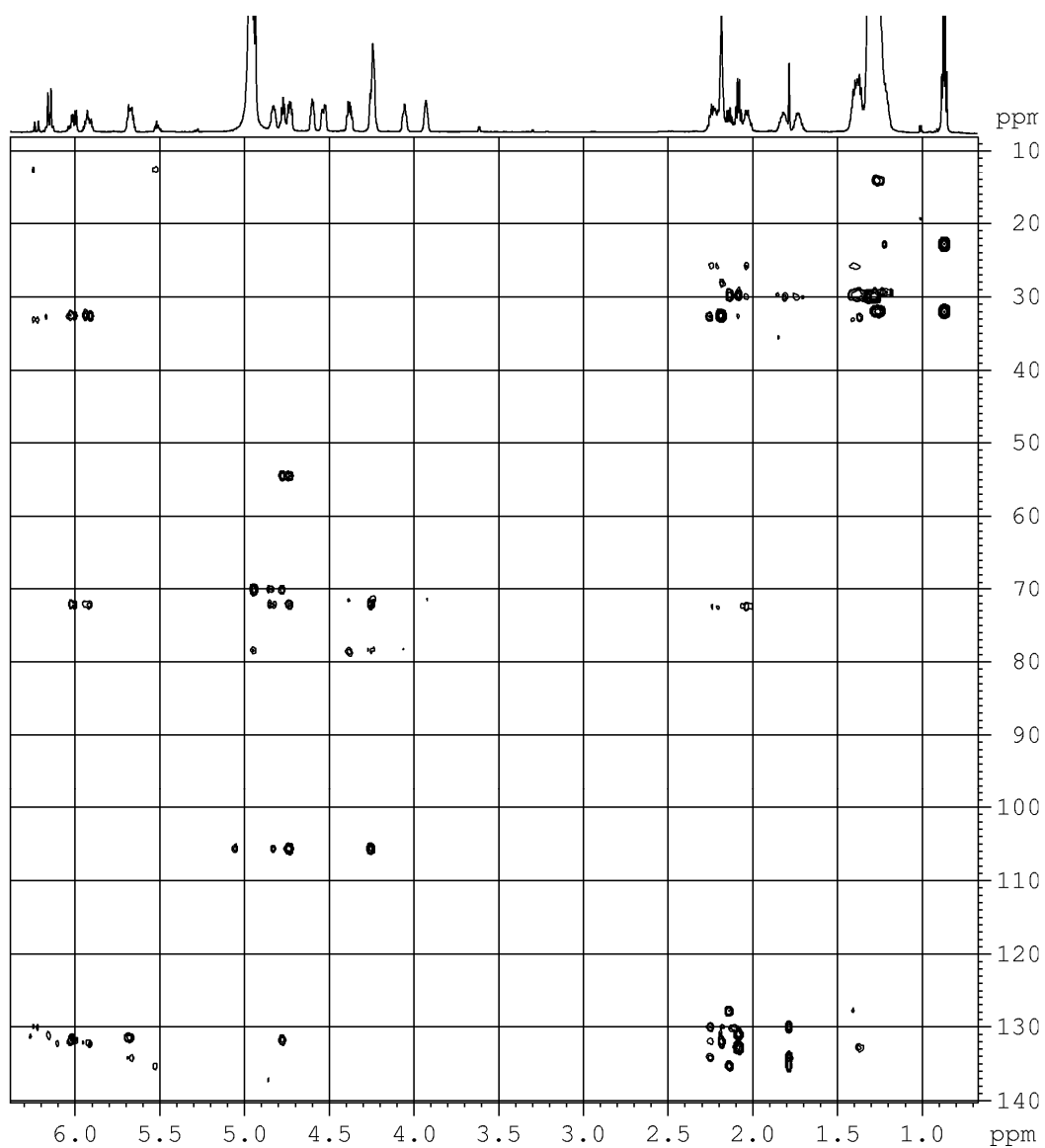
Spettro HSQC del composto **10a** in C_5D_5N a 700 MHz



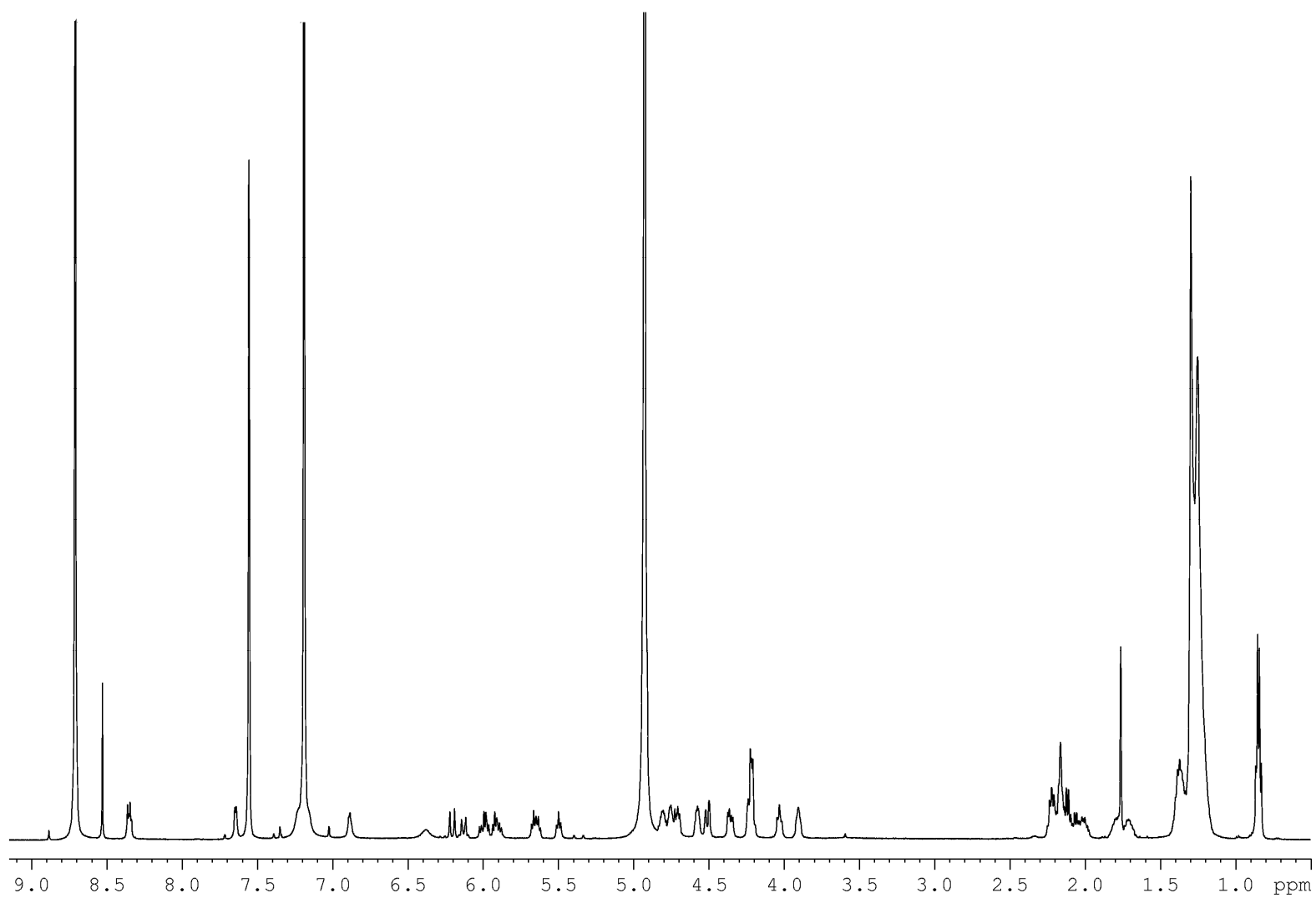
Regione a campi bassi dello spettro HSQC
del composto **10a** in C_5D_5N a 700 MHz



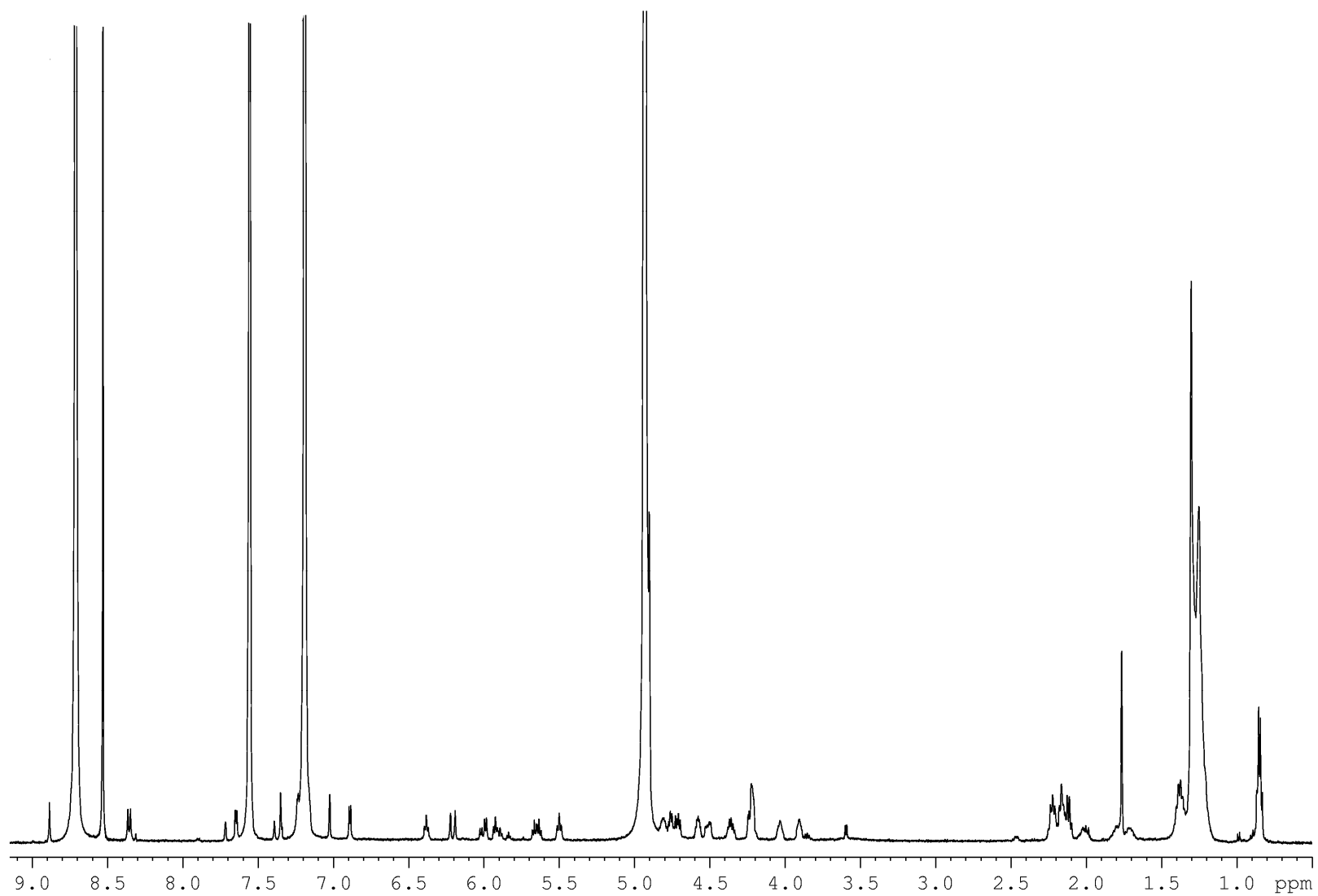
Regione a campi alti dello spettro HSQC
del composto **10a** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 700 MHz



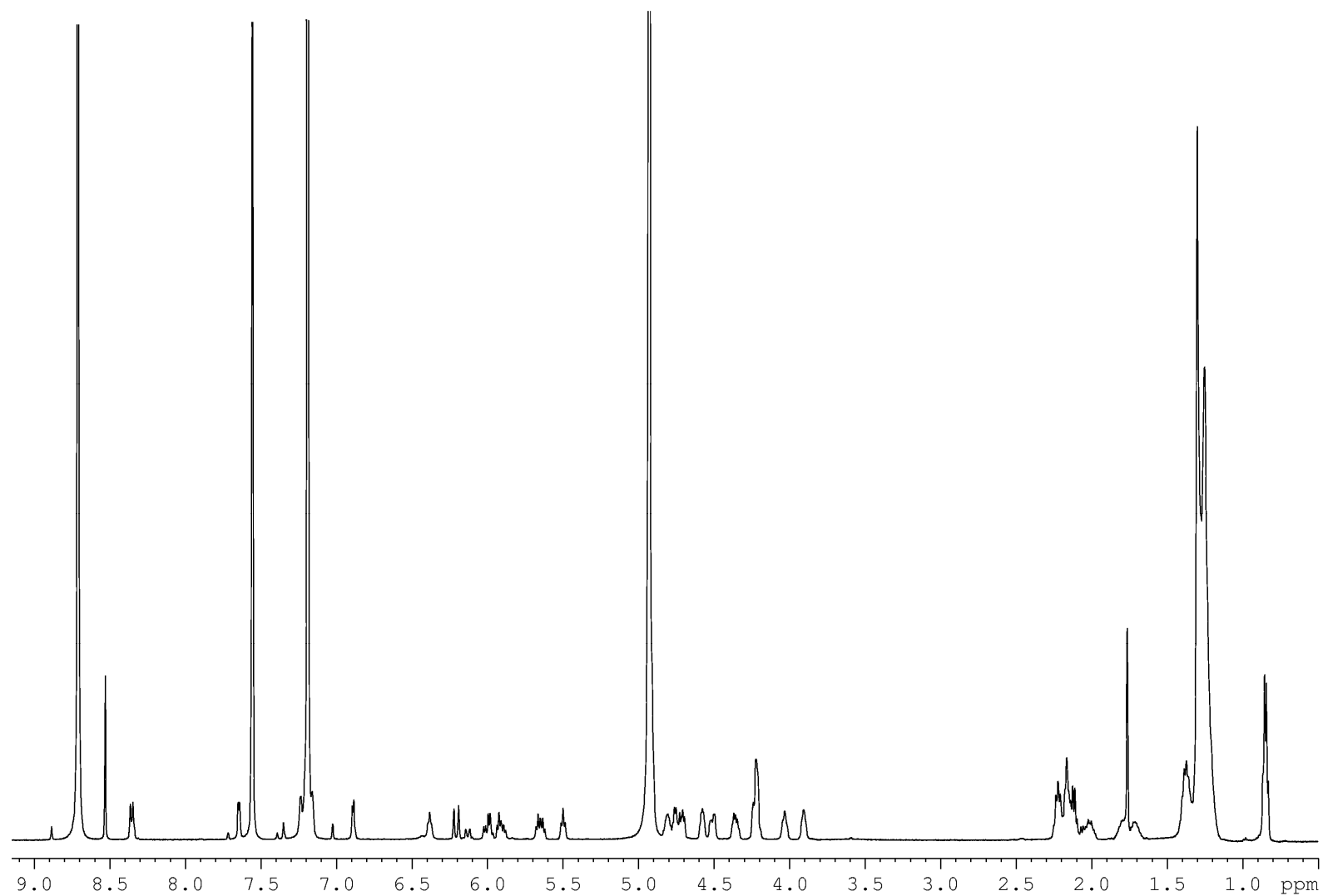
Spettro HMBC del composto **10a** in C_5D_5N a 700 MHz



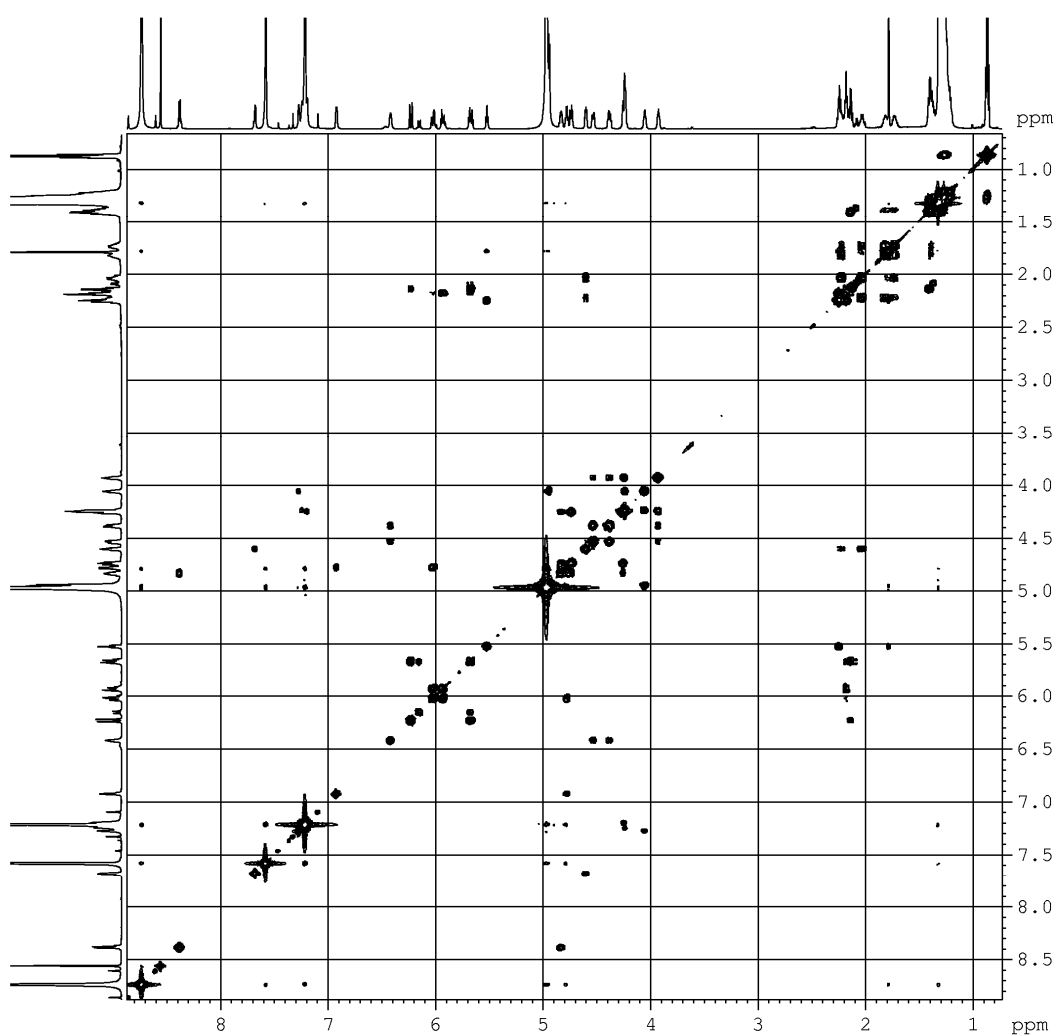
Spettro ^1H -NMR della miscela dei composti **10b** + **10c** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 500 MHz



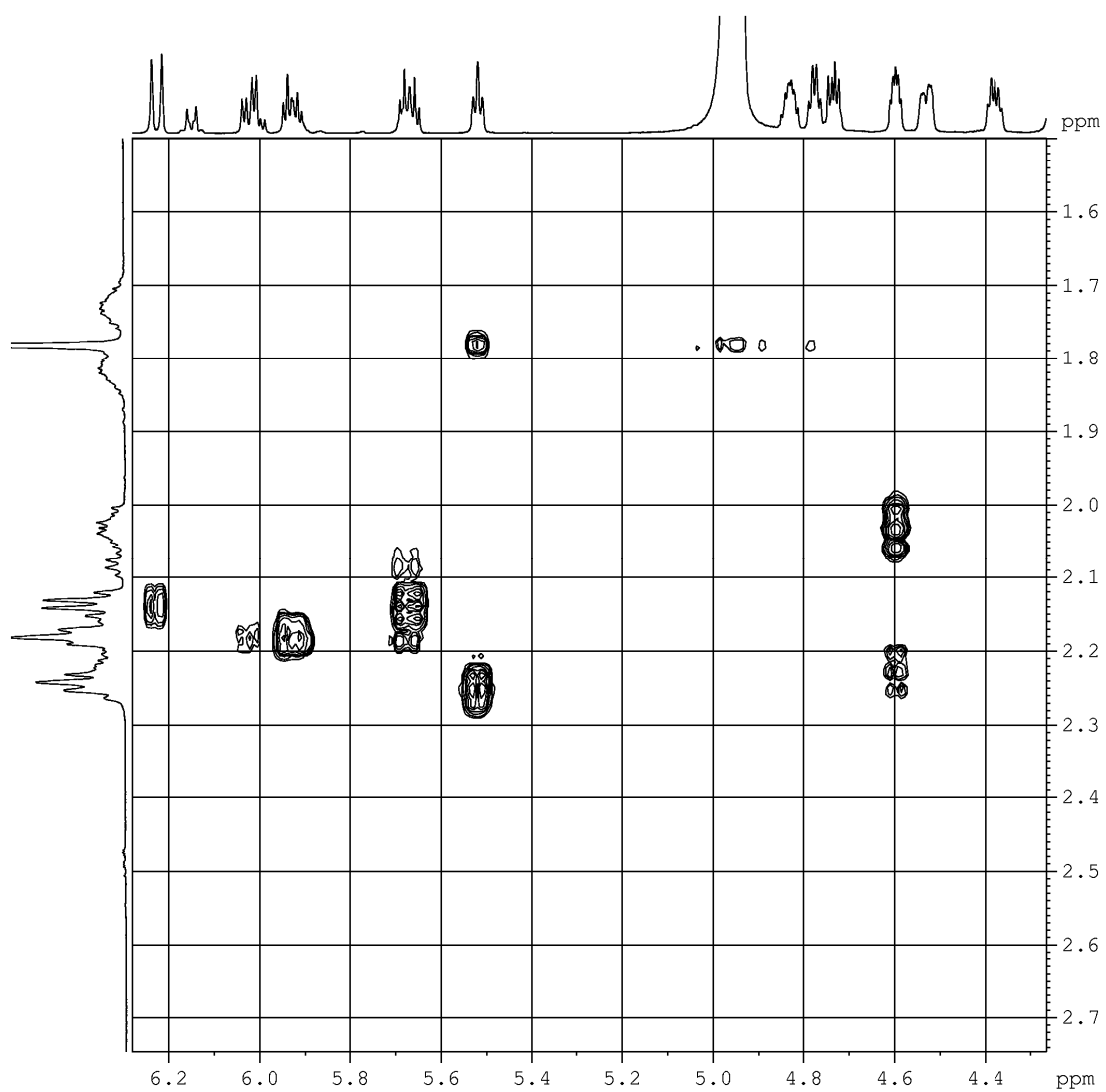
Spettro ^1H -NMR della miscela dei composti **10d** + **10e** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 500 MHz



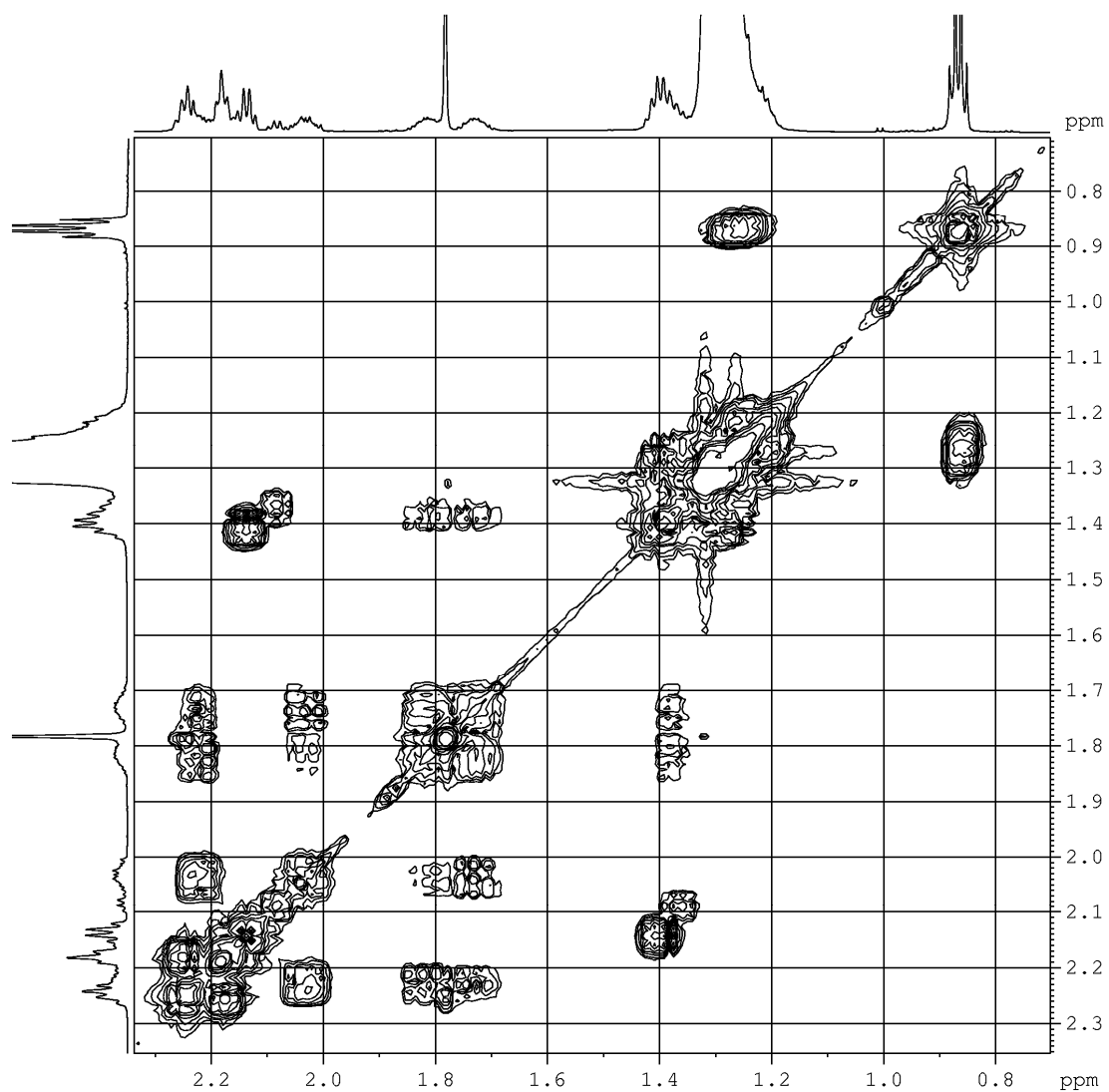
Spettro ^1H -NMR del composto **10f** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 500 MHz



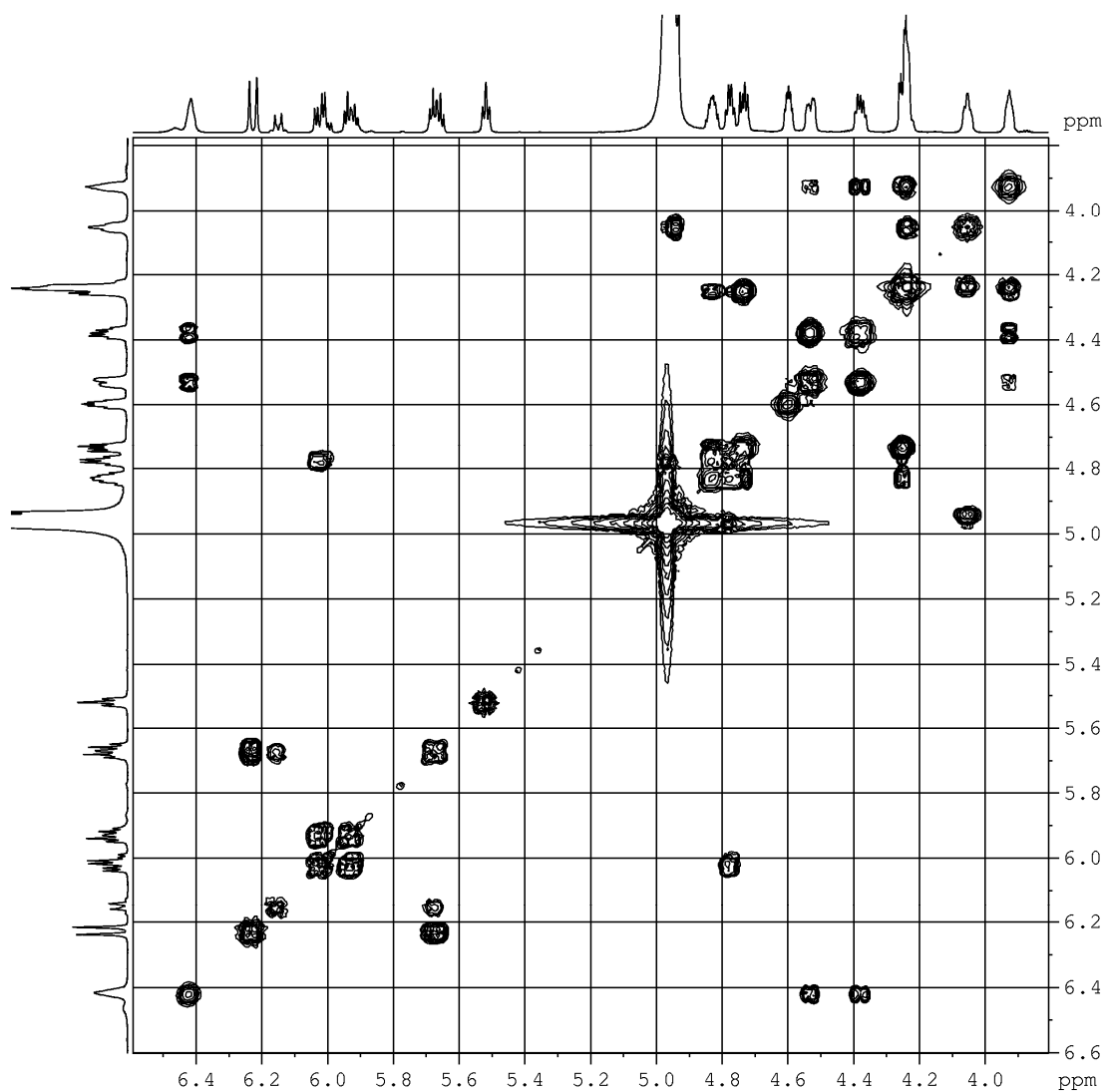
Spettro COSY del composto **10f** in C_5D_5N a 700 MHz



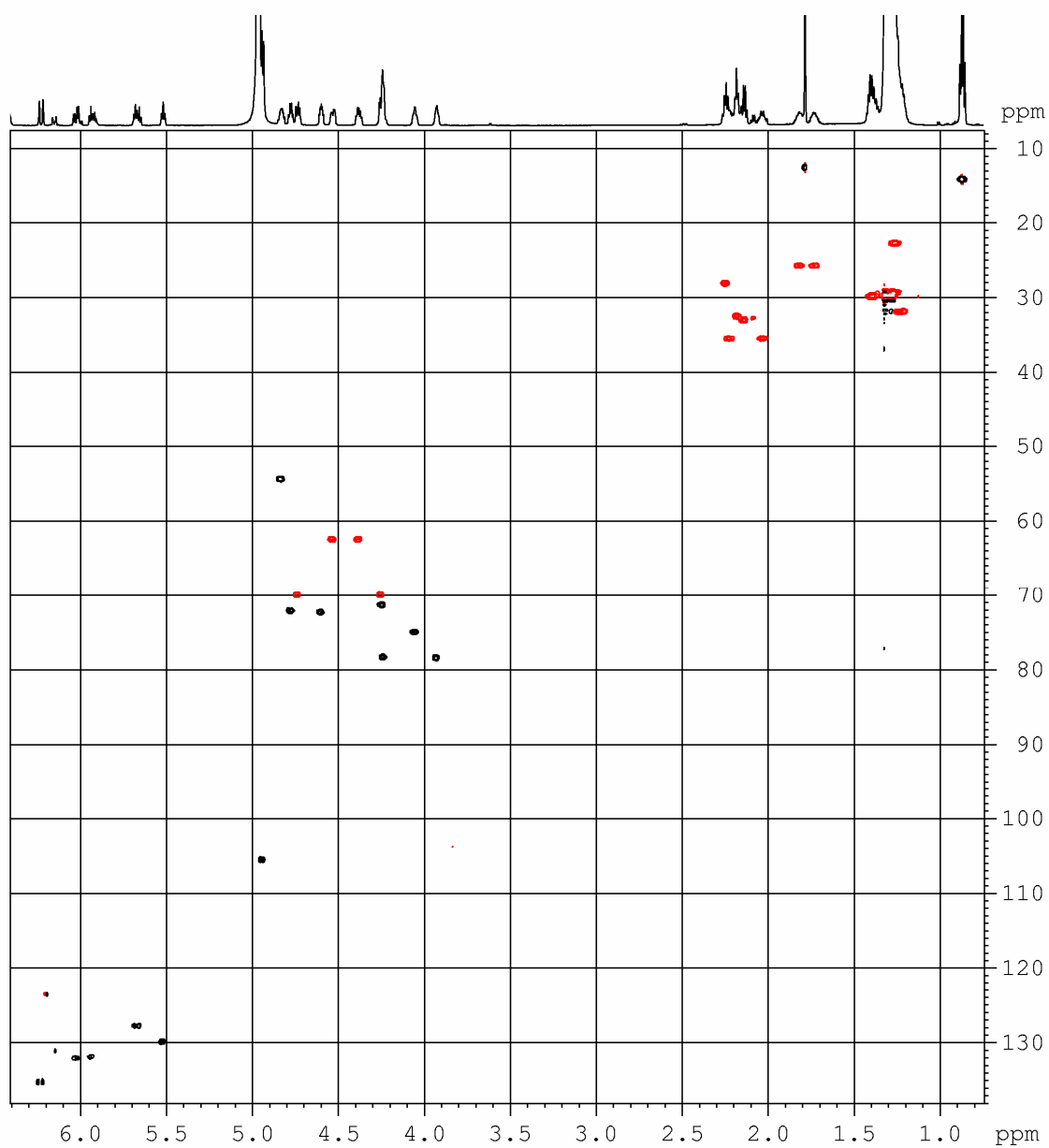
Ingrandimento dello spettro COSY del
composto **10f** in C_5D_5N a 700 MHz



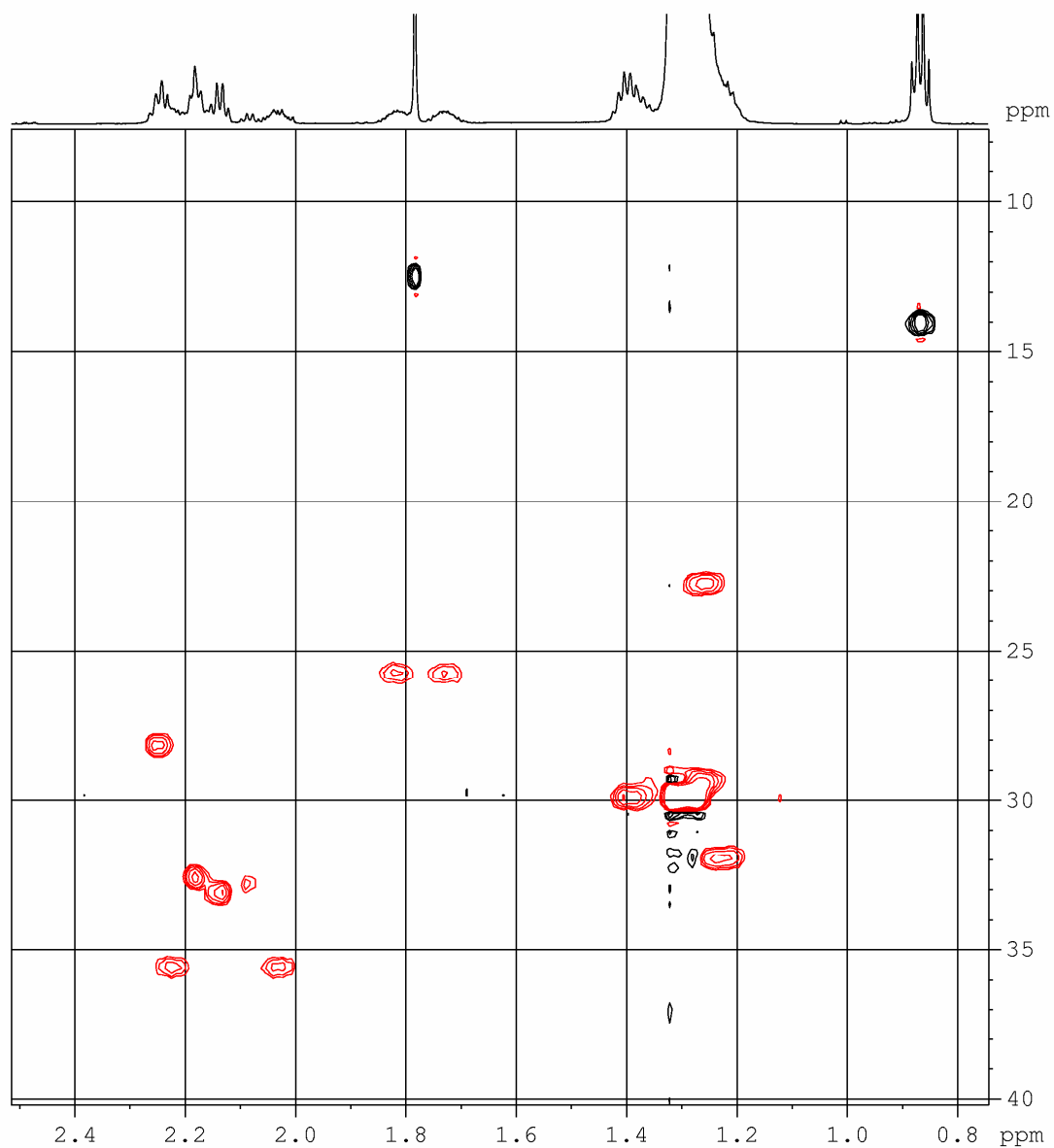
Regione a campi alti dello spettro COSY
del composto **10f** in C_5D_5N a 700 MHz



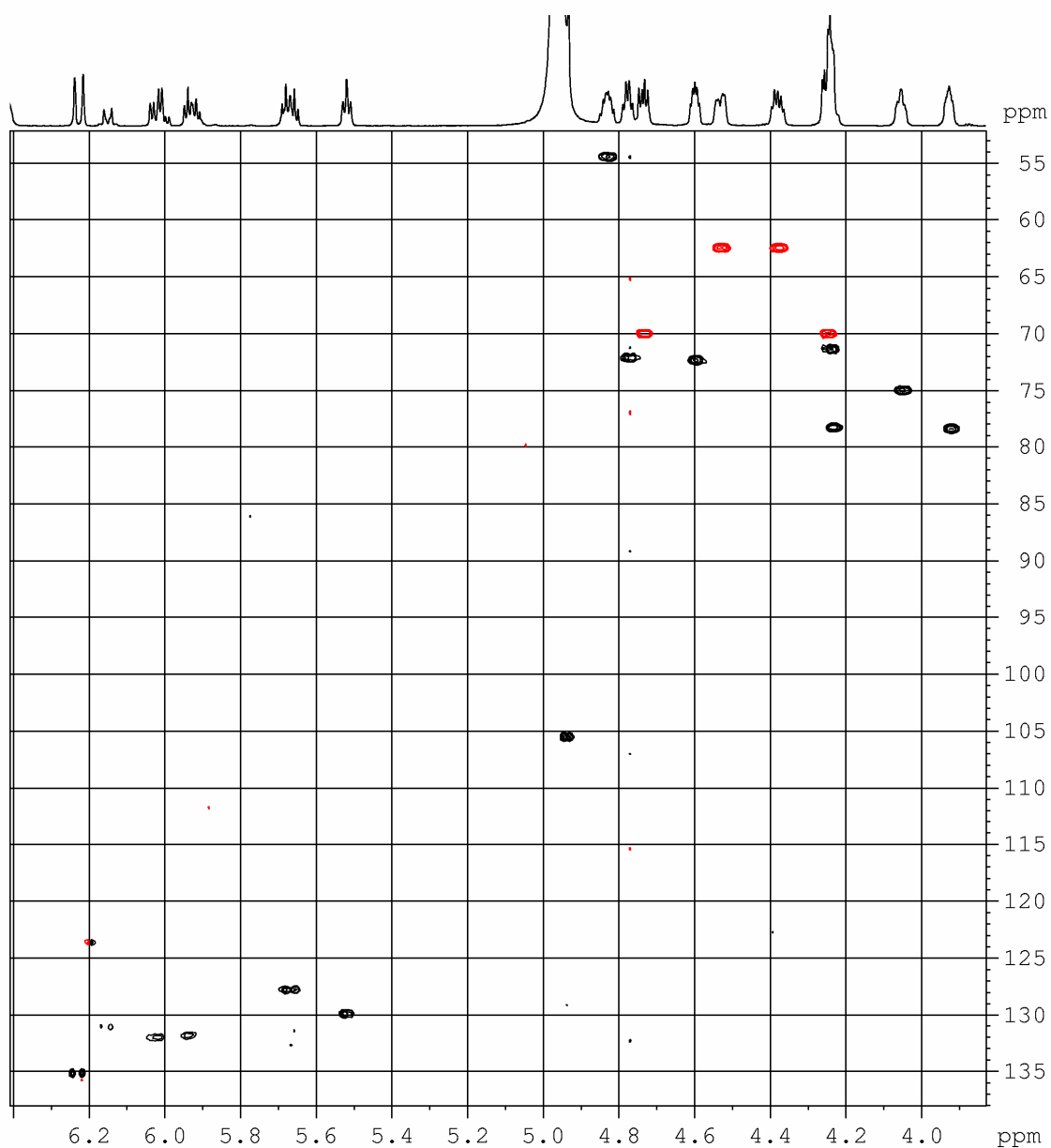
Regione a campi bassi dello spettro COSY
del composto **10f** in C₅D₅N a 700 MHz



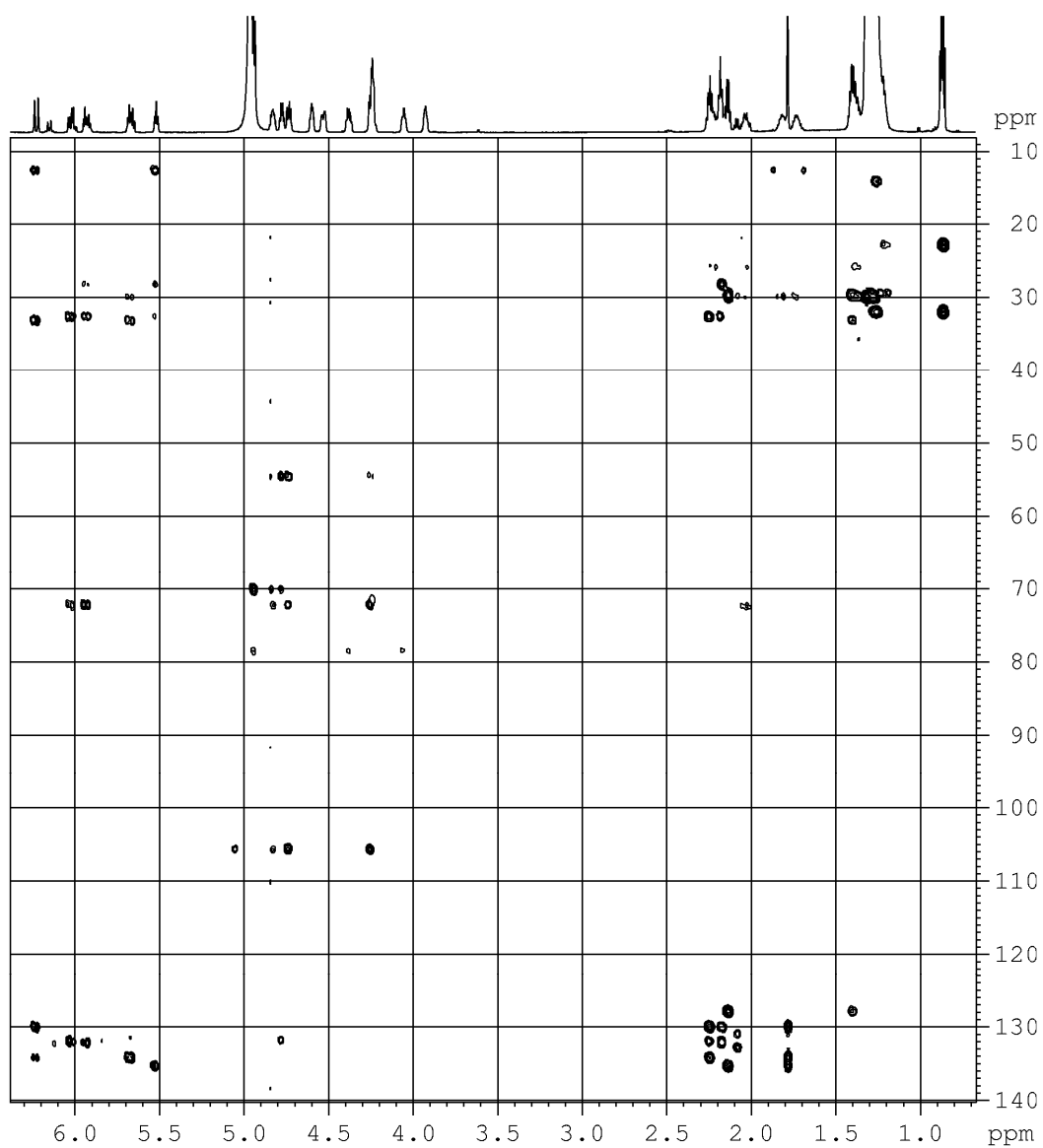
Spettro HSQC del composto **10f** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 700 MHz



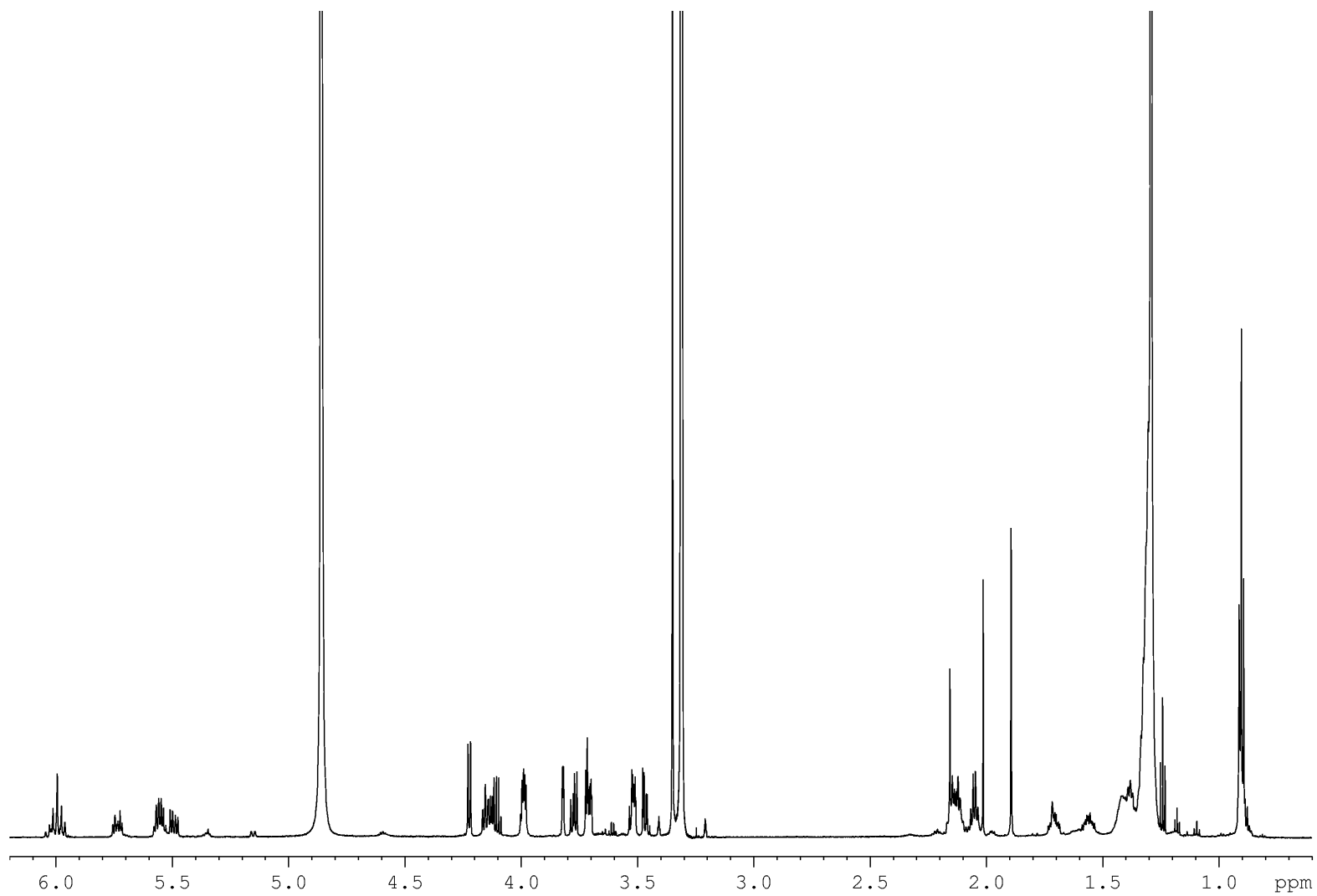
Regione a campi alti dello spettro HSQC
del composto **10f** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 700 MHz



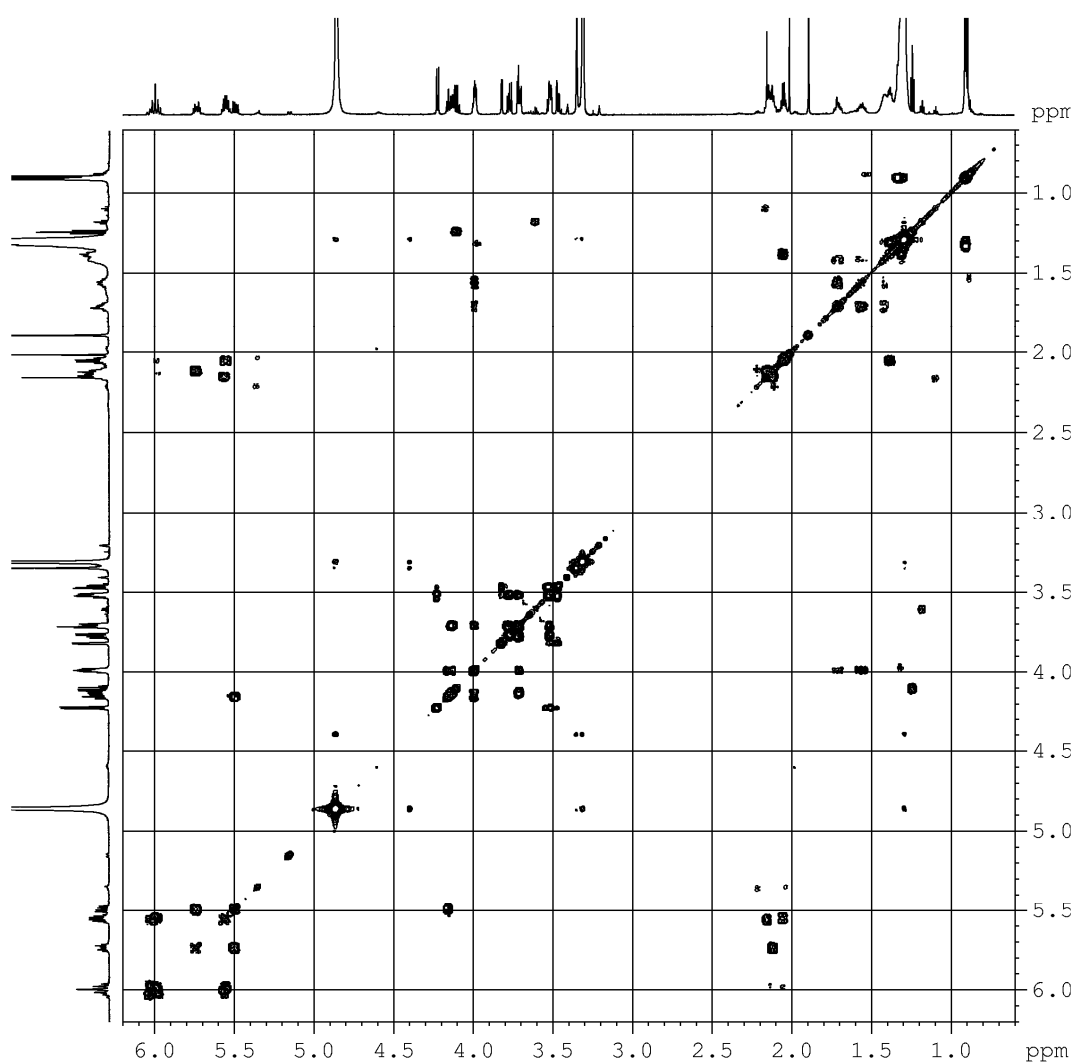
Regione a campi bassi dello spettro HSQC
del composto **10f** in C_5D_5N a 700 MHz



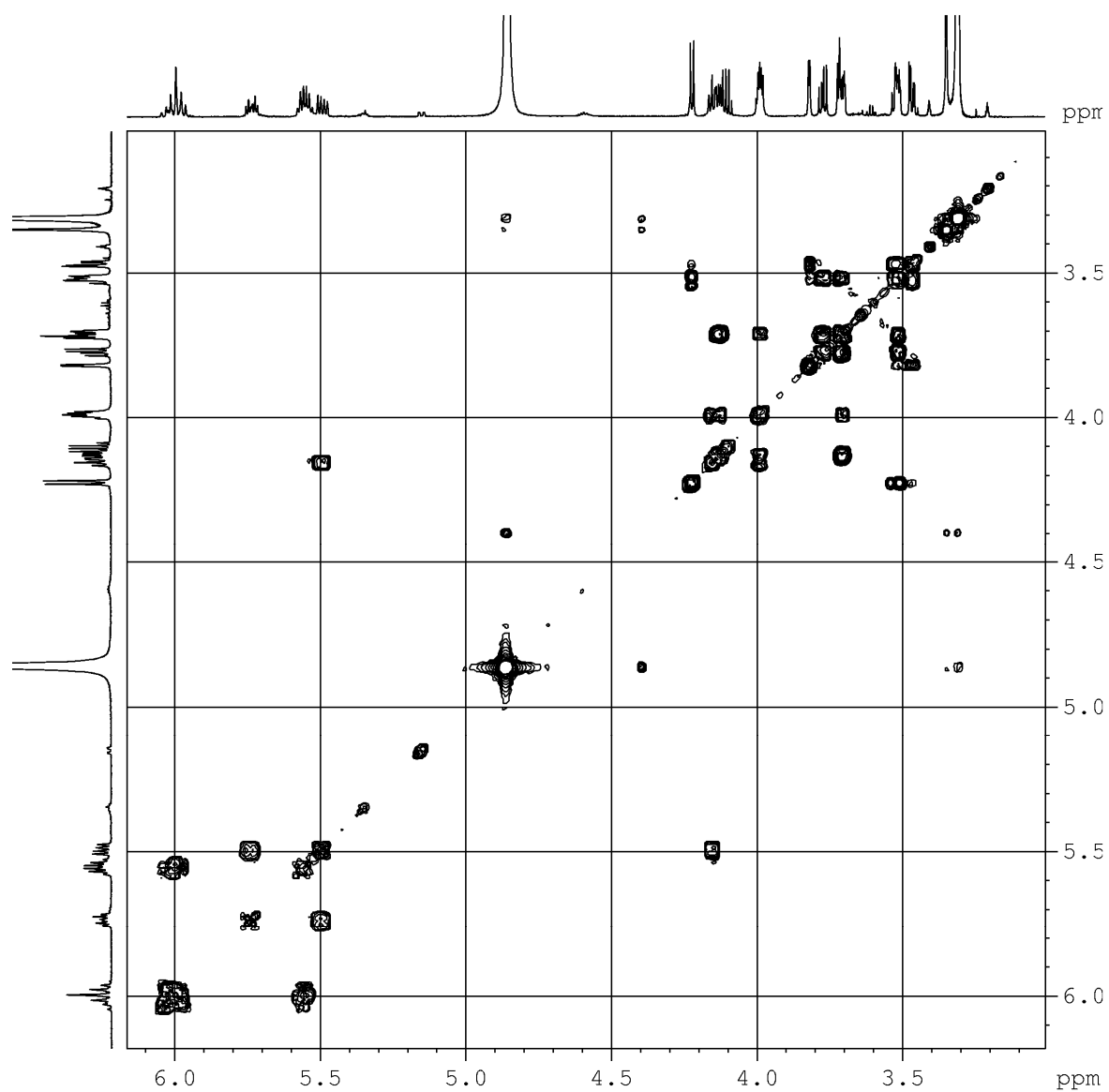
Spettro HMBC del composto **10f** in C_5D_5N a 700 MHz



Spettro ^1H -NMR del composto **11a** in CD_3OD a 700 MHz



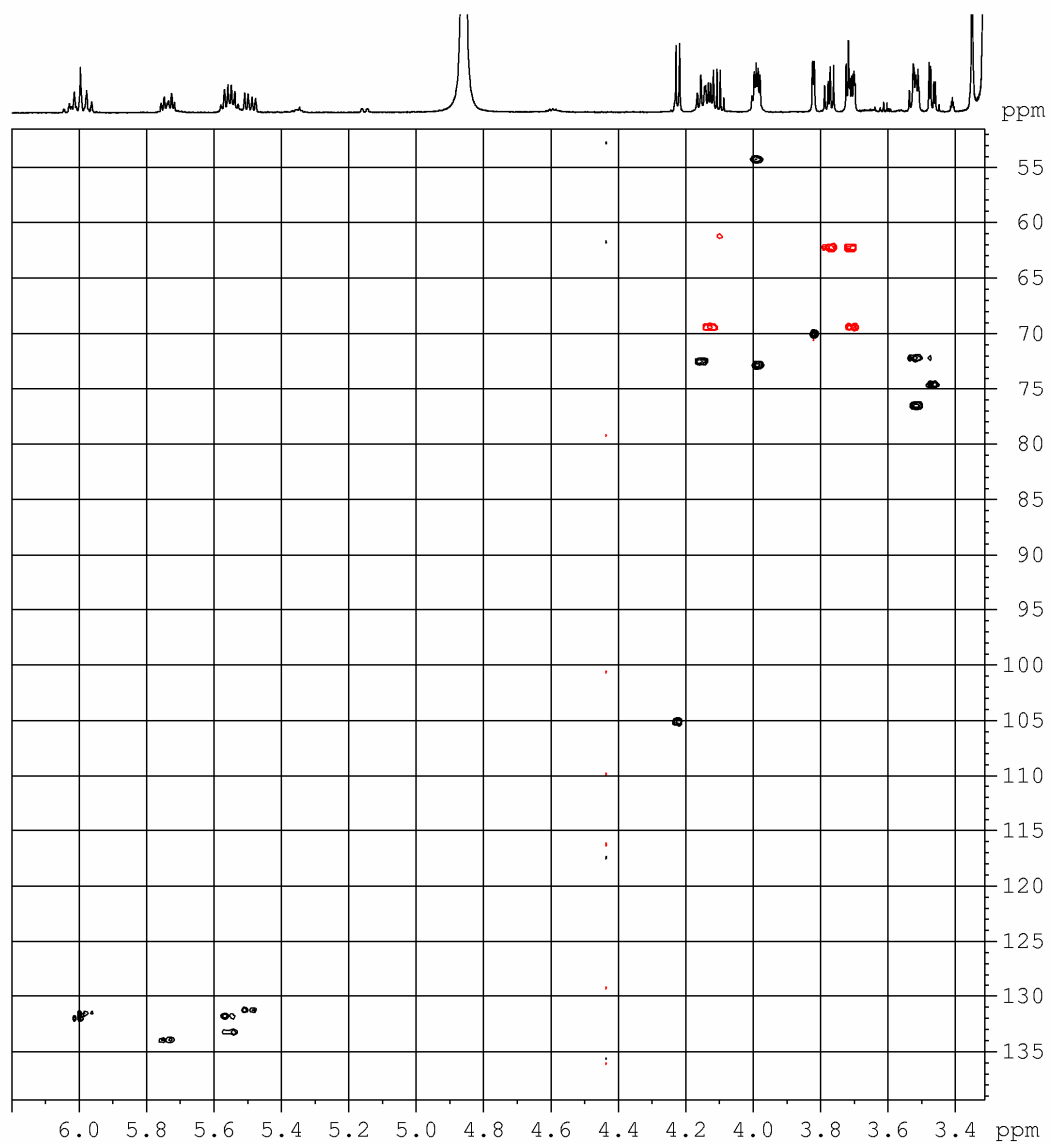
Spettro COSY del composto **11a** in CD_3OD a 700 MHz



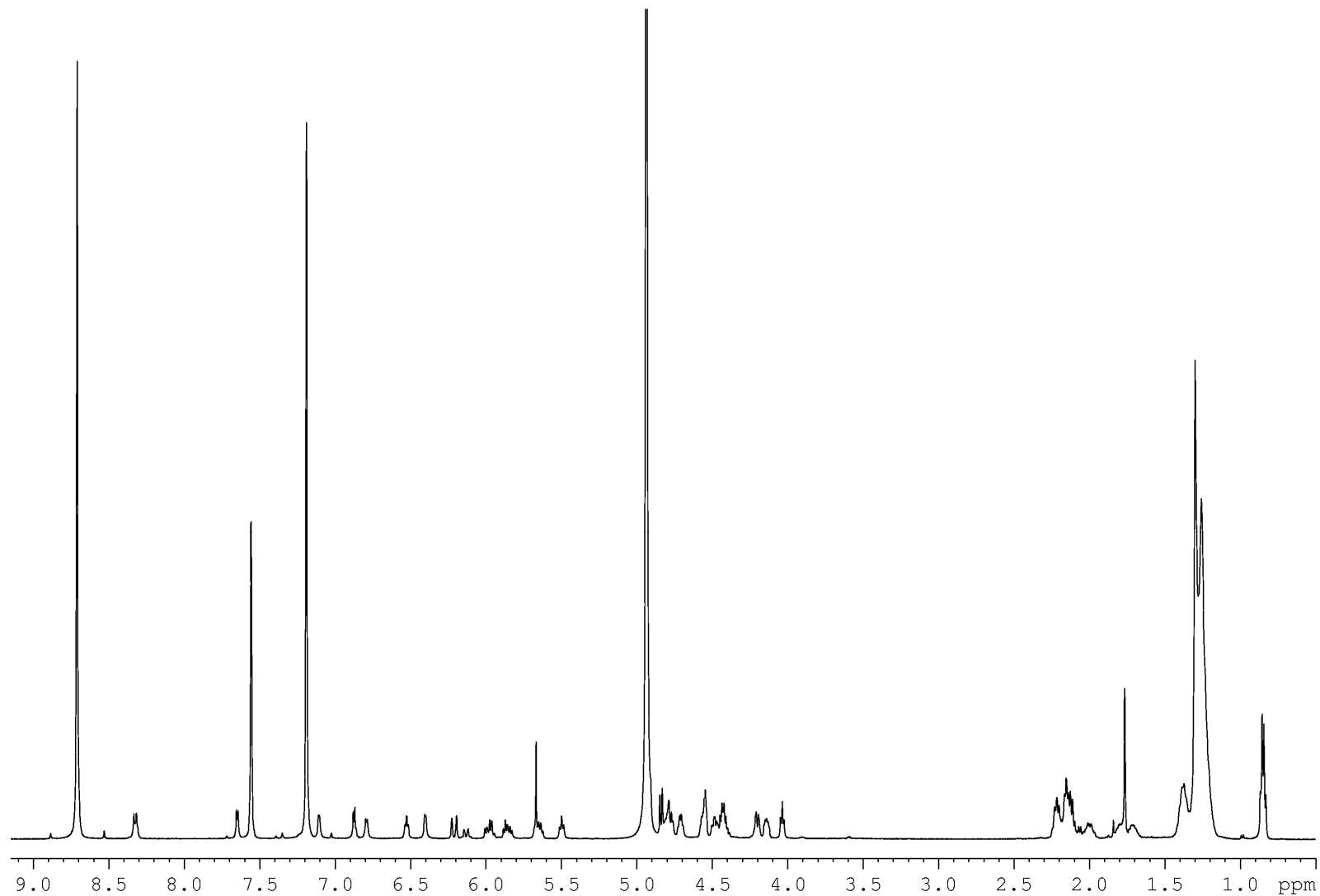
Regione a campi bassi dello spettro COSY
del composto **11a** in CD₃OD a 700 MHz



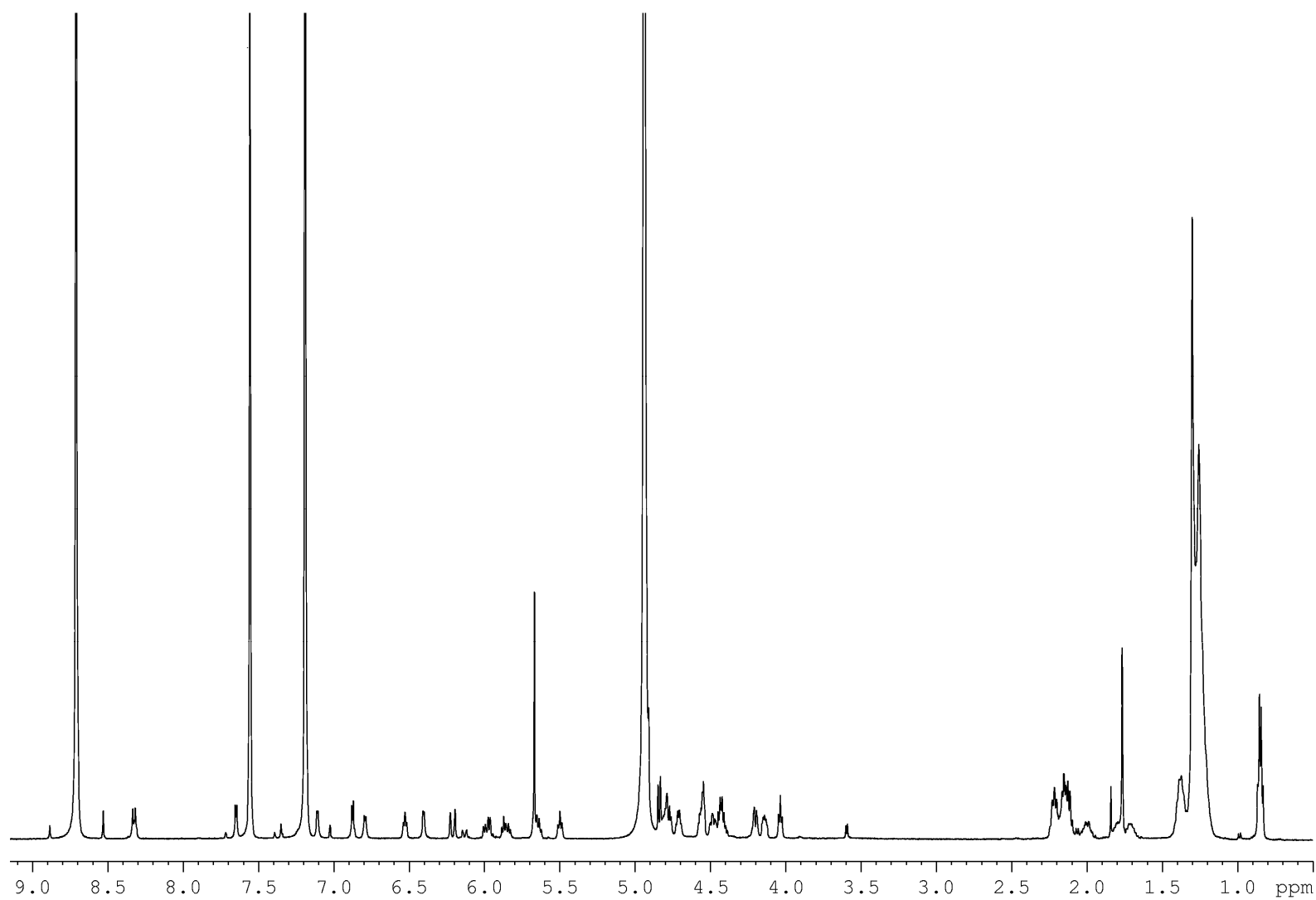
Spettro HSQC del composto **11a** in CD₃OD a 700 MHz



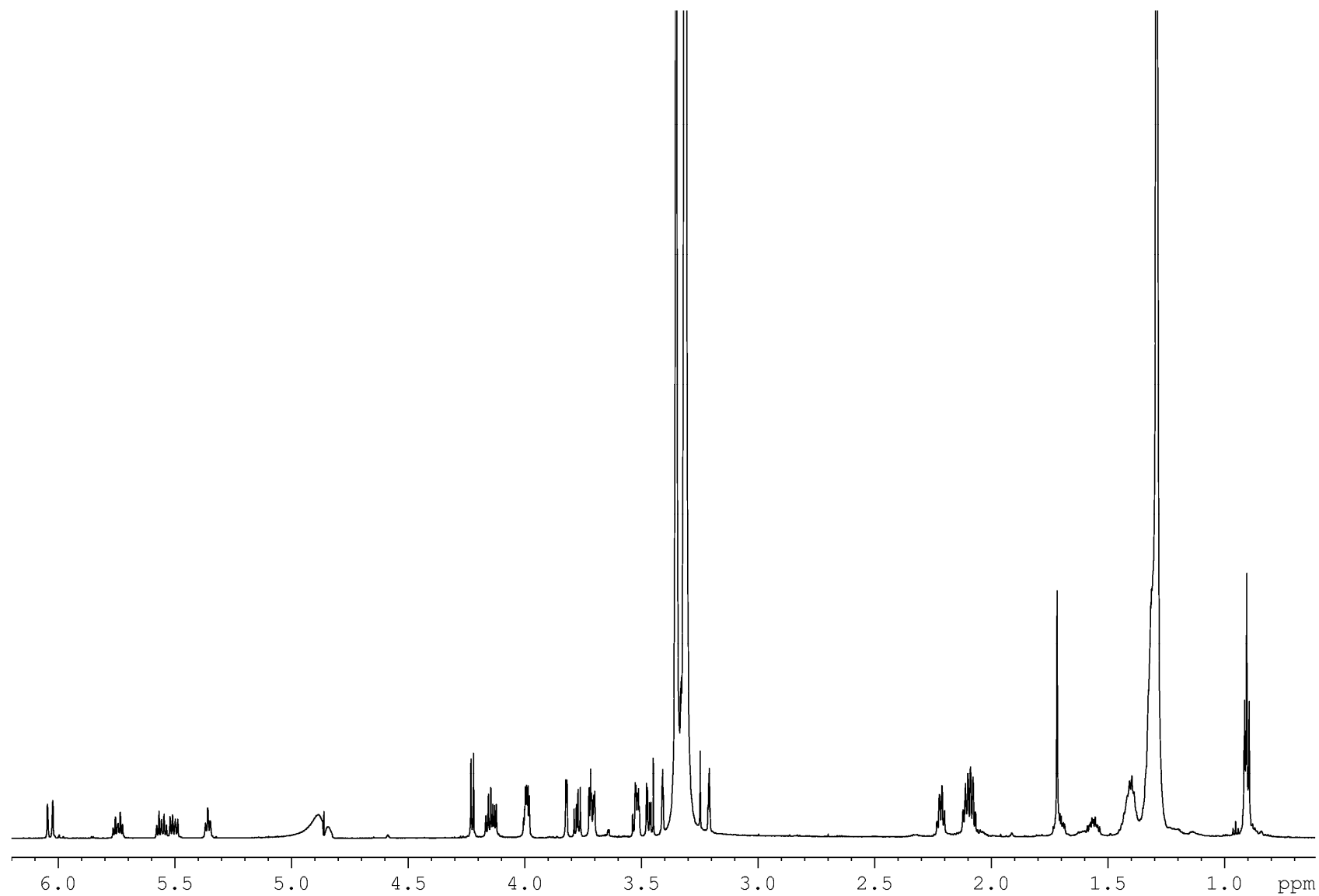
Regione a campi bassi dello spettro HSQC
del composto **11a** in CD_3OD a 700 MHz



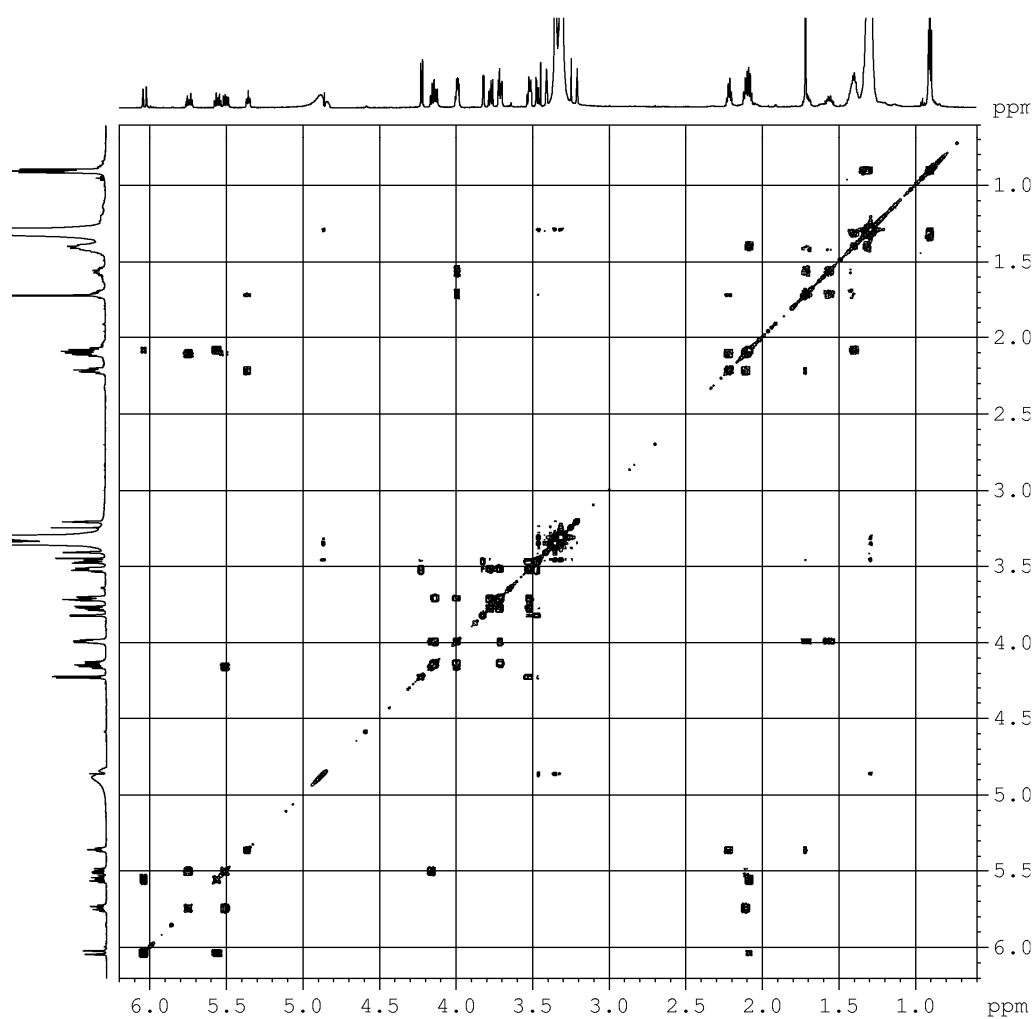
Spettro ^1H -NMR della miscela dei composti **11b**+**11c** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 700 MHz



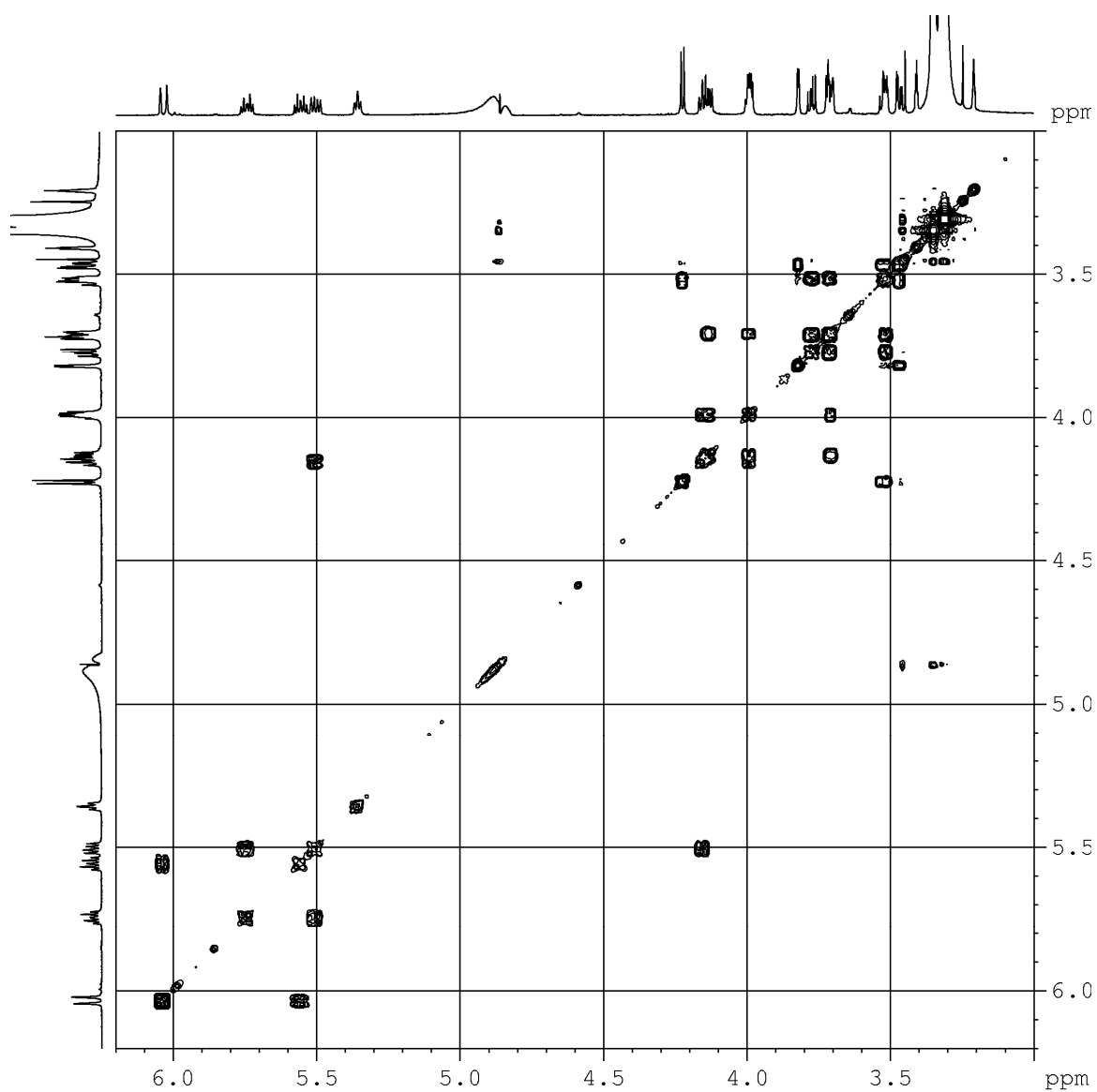
Spettro ^1H -NMR della miscela dei composti **11d**+**11e** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 700 MHz



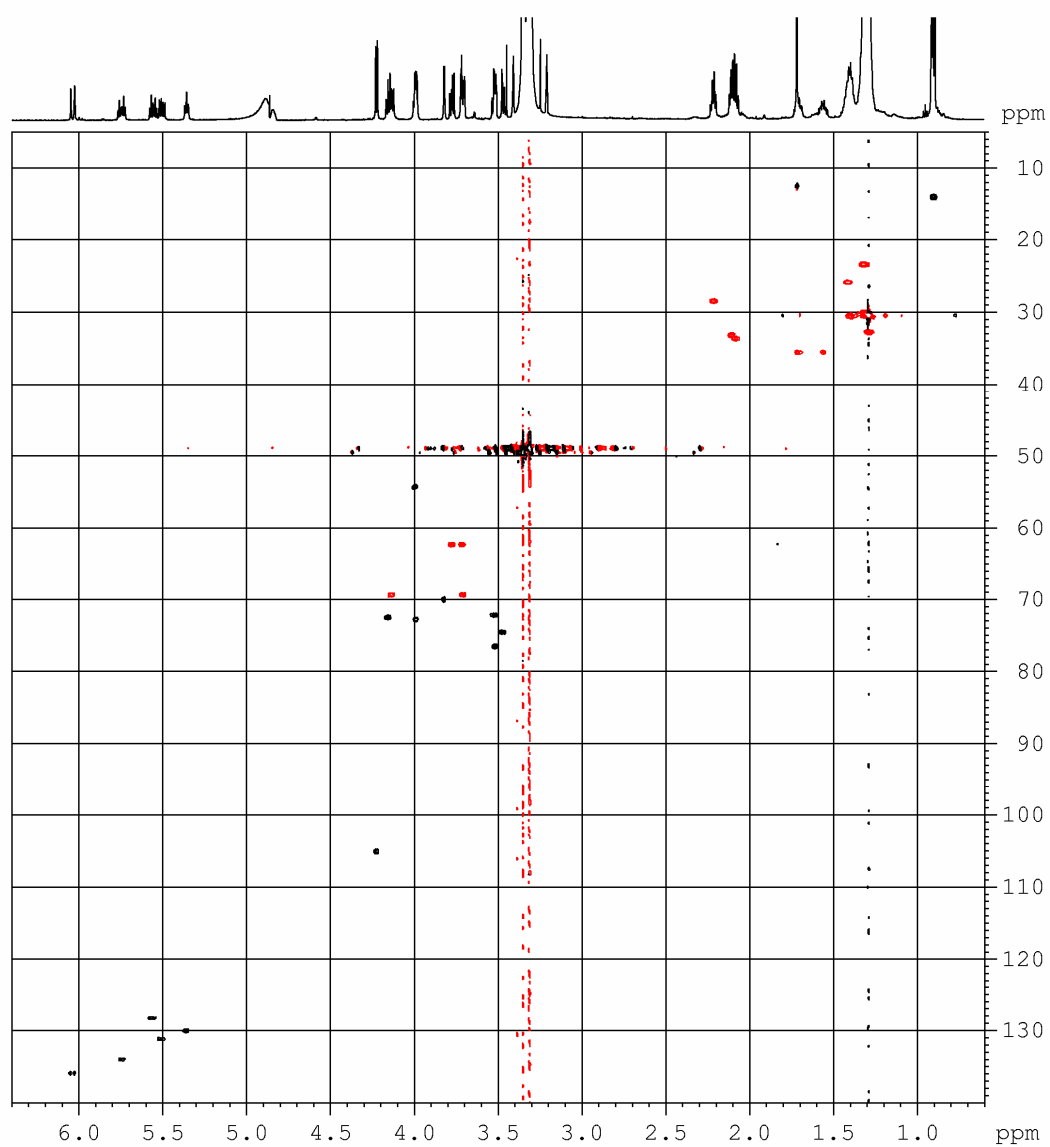
Spettro ^1H -NMR del composto **11f** in CD_3OD a 700 MHz



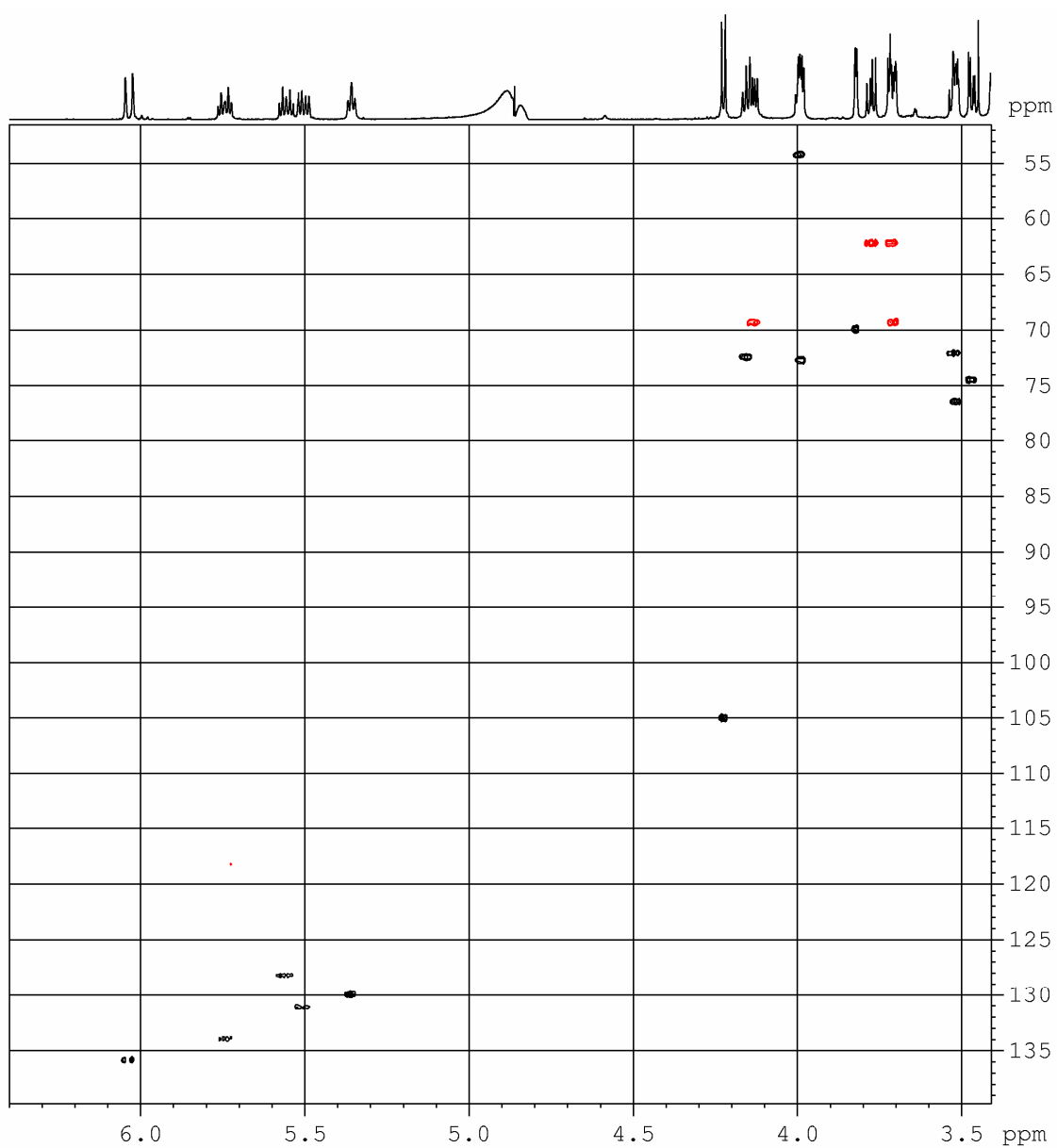
Spettro COSY del composto **11f** in CD_3OD a 700 MHz



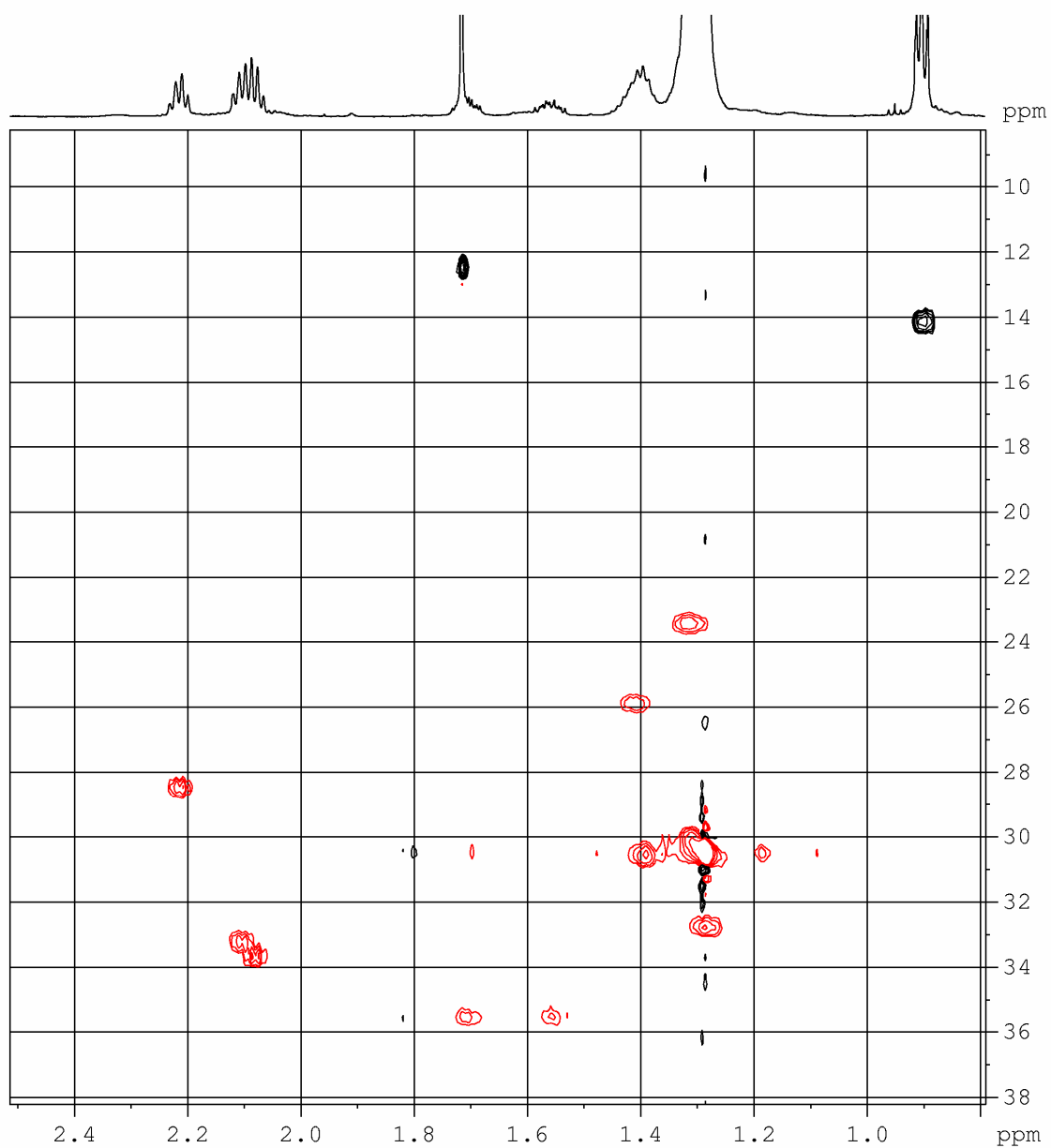
Regione a campi bassi dello spettro COSY
del composto **11f** in CD_3OD a 700 MHz



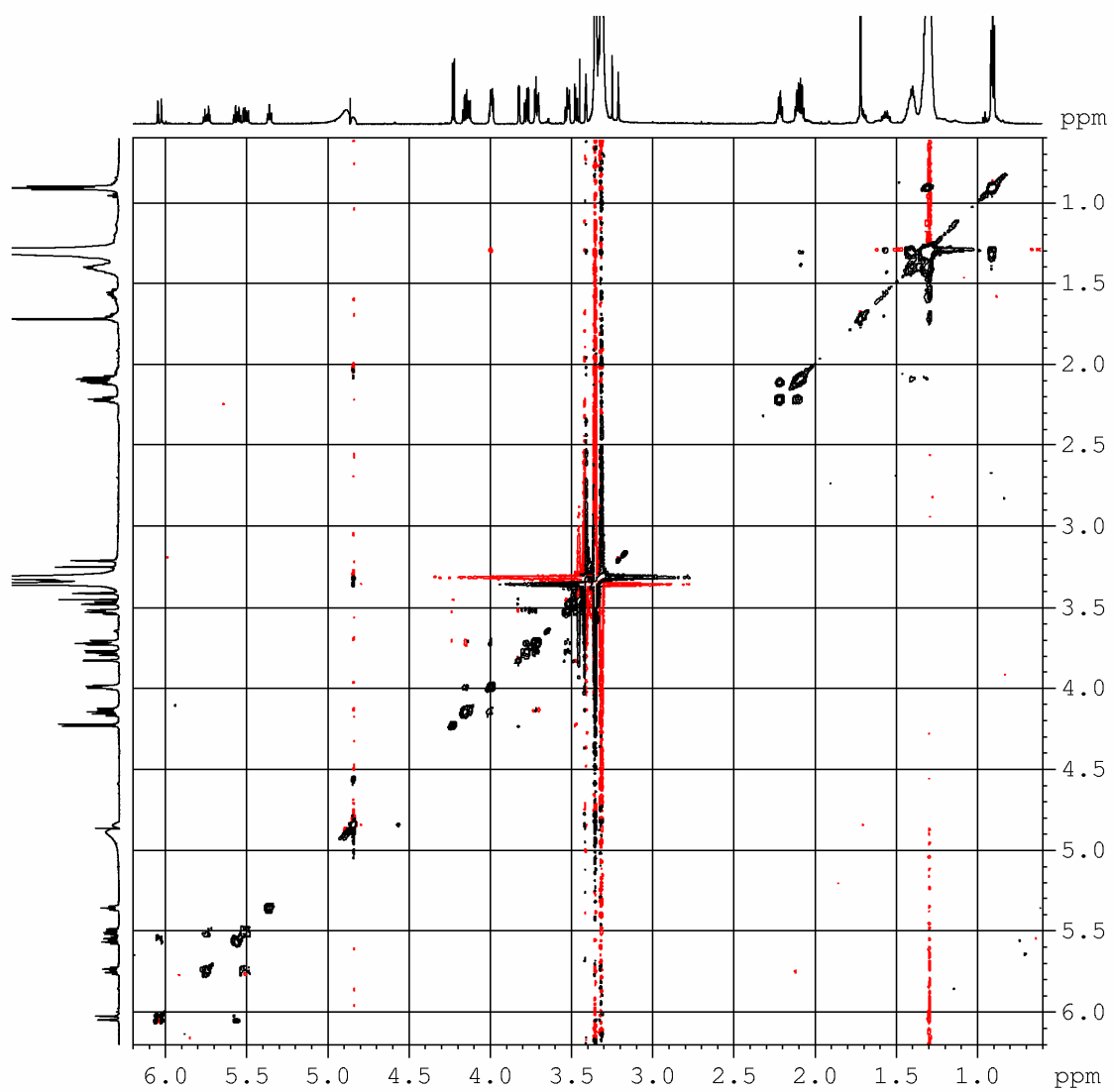
Spettro HSQC del composto **11f** in CD_3OD a 700 MHz



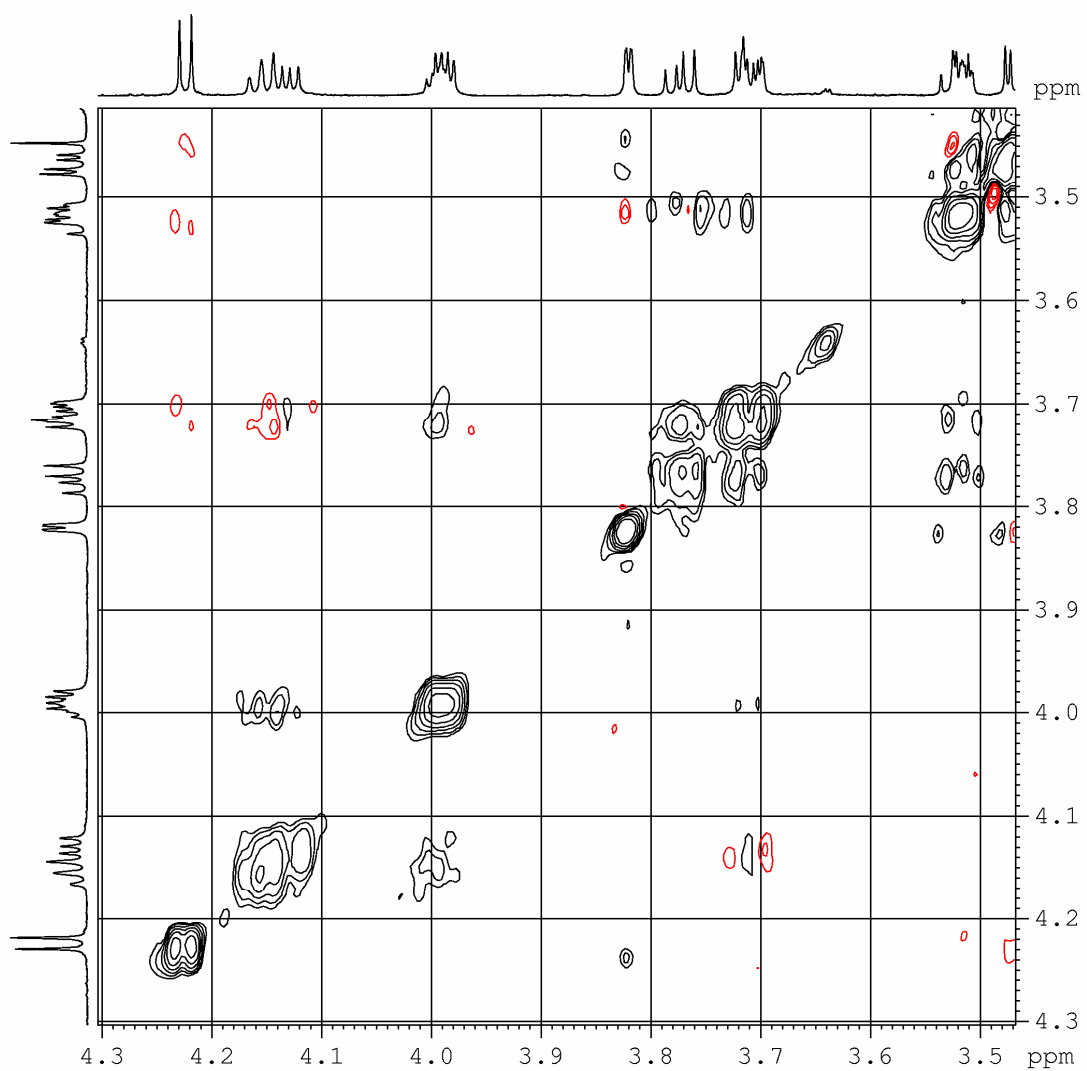
Regione a campi bassi dello spettro HSQC
del composto **11f** in CD₃OD a 700 MHz



Regione a campi alti dello spettro HSQC
del composto **11f** in CD_3OD a 700 MHz



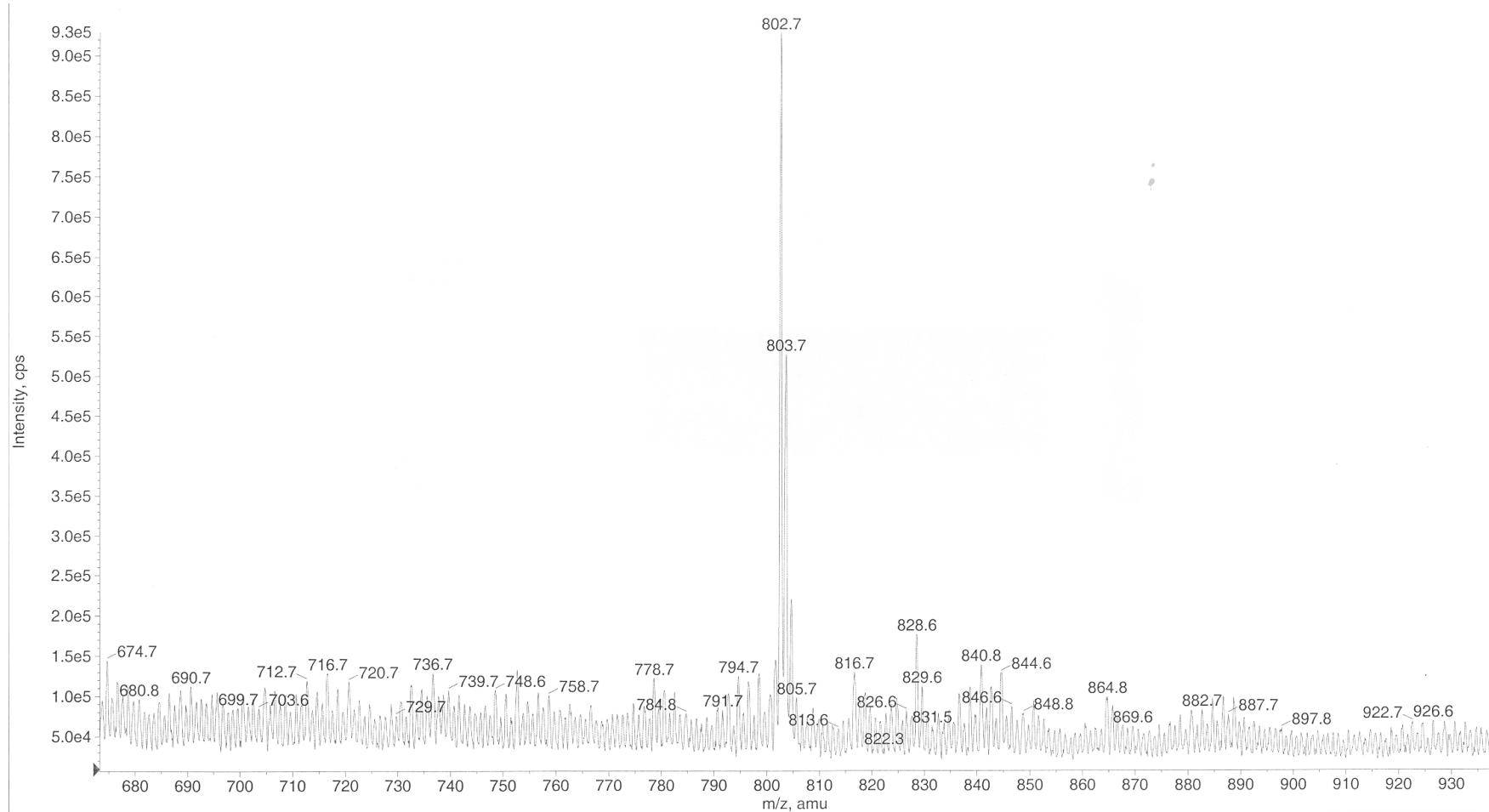
Spettro ROESY del composto **11f** in CD₃OD a 500 MHz



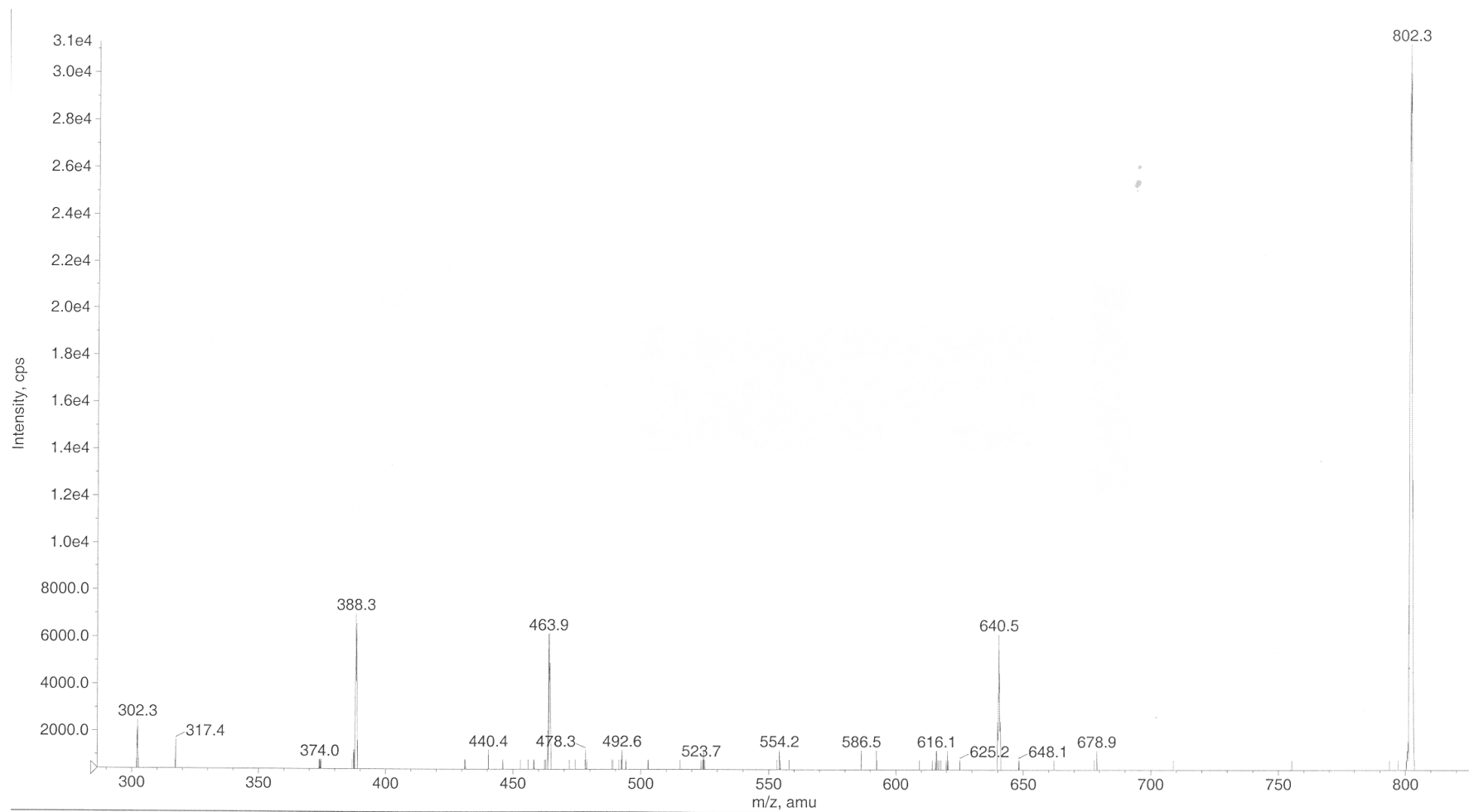
Regione a campi medi dello spettro ROESY
del composto **11f** in CD_3OD a 500 MHz



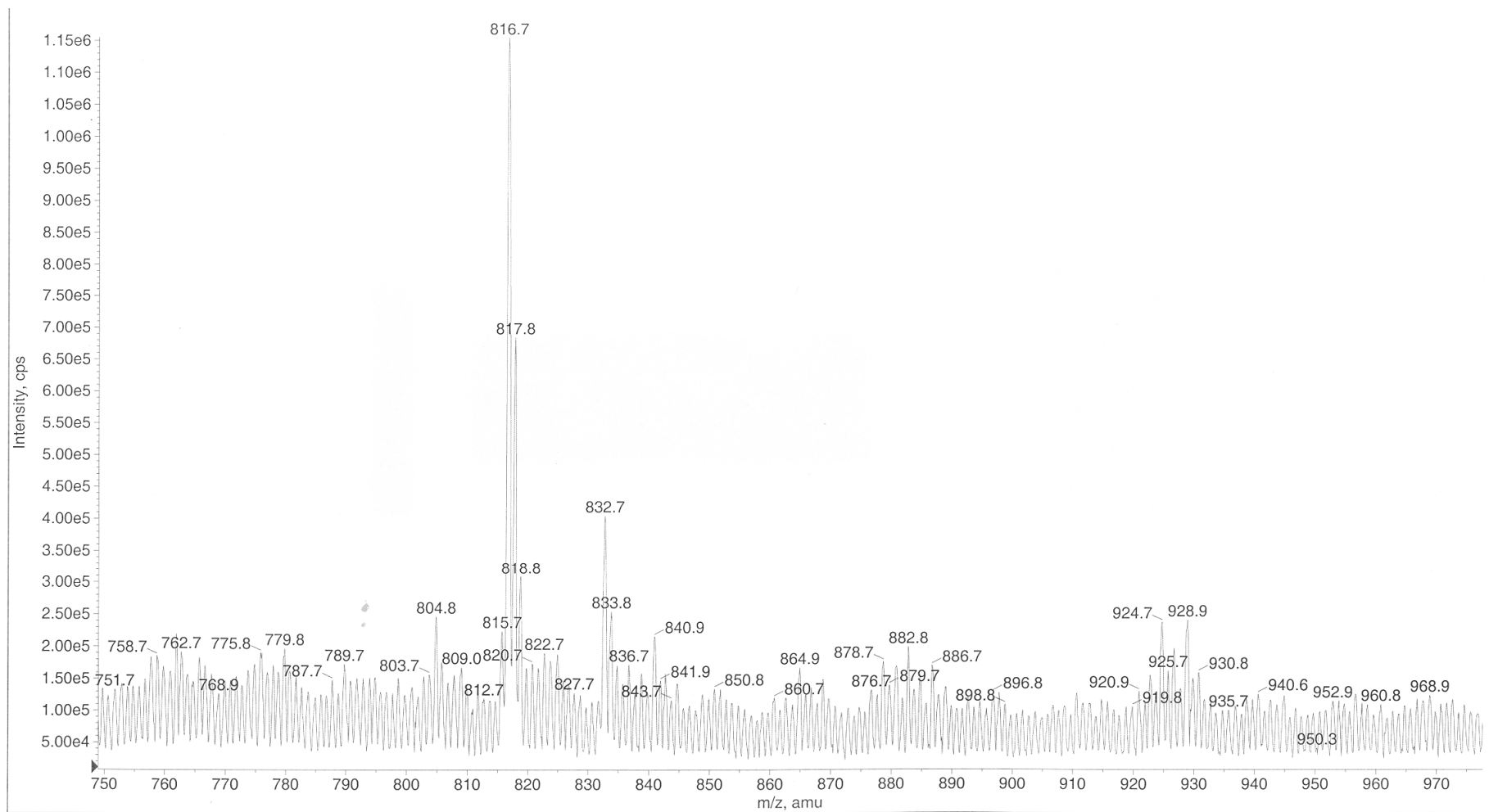
Spettro HMBC del composto **11f** in CD₃OD a 700 MHz



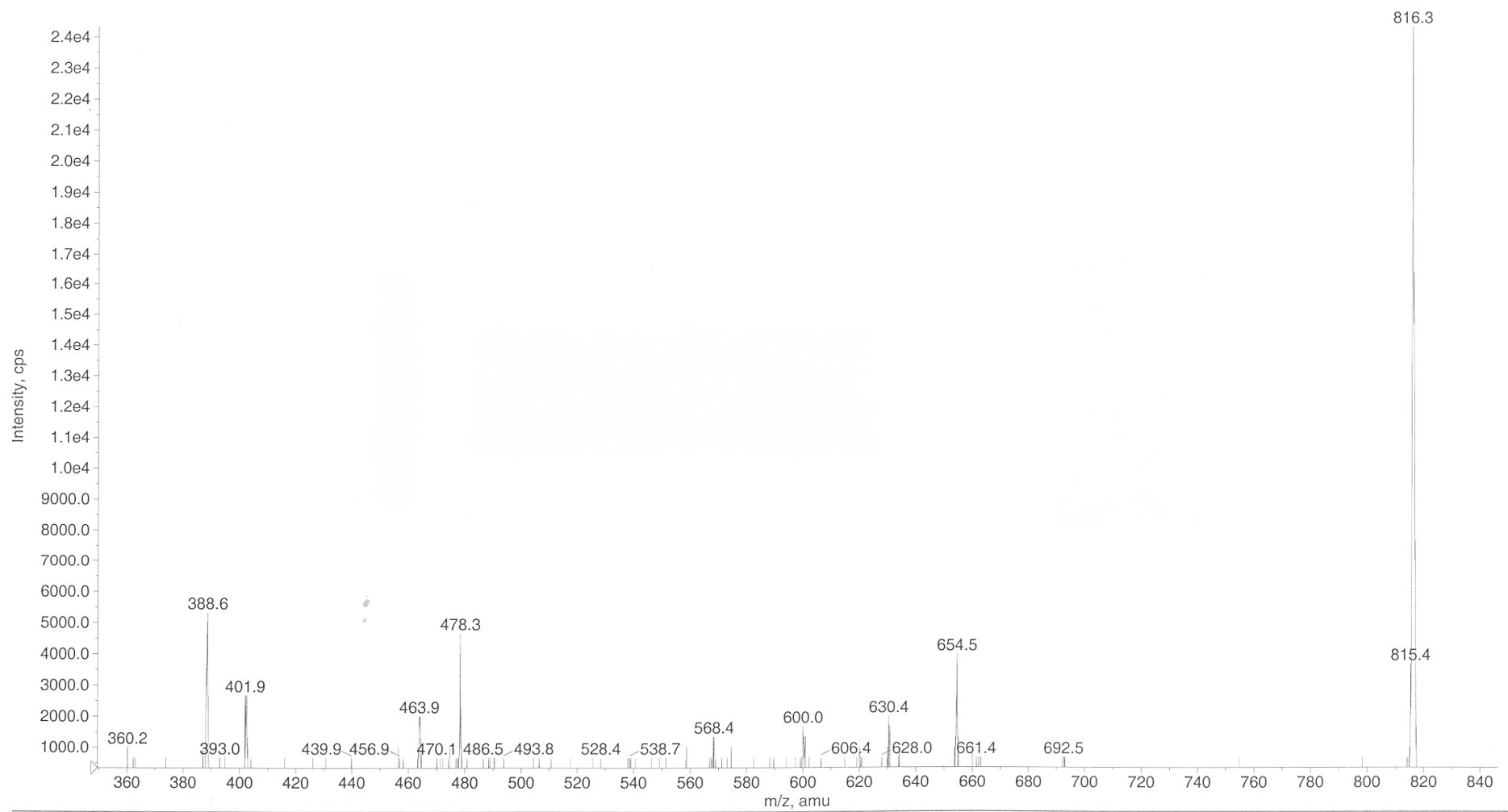
Spettro ESI MS del composto **10a**



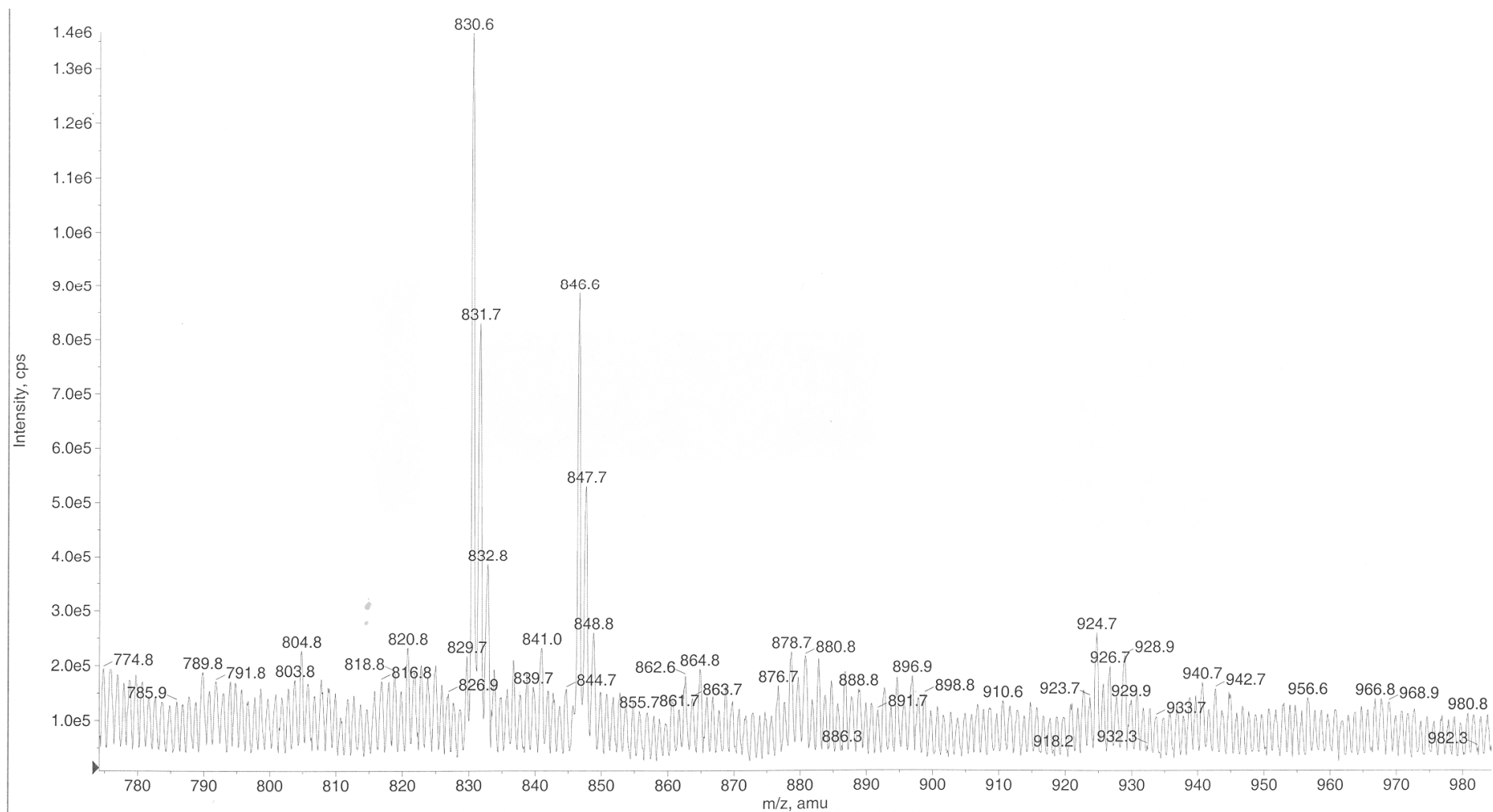
Spettro ESI MS/MS del composto **10a**



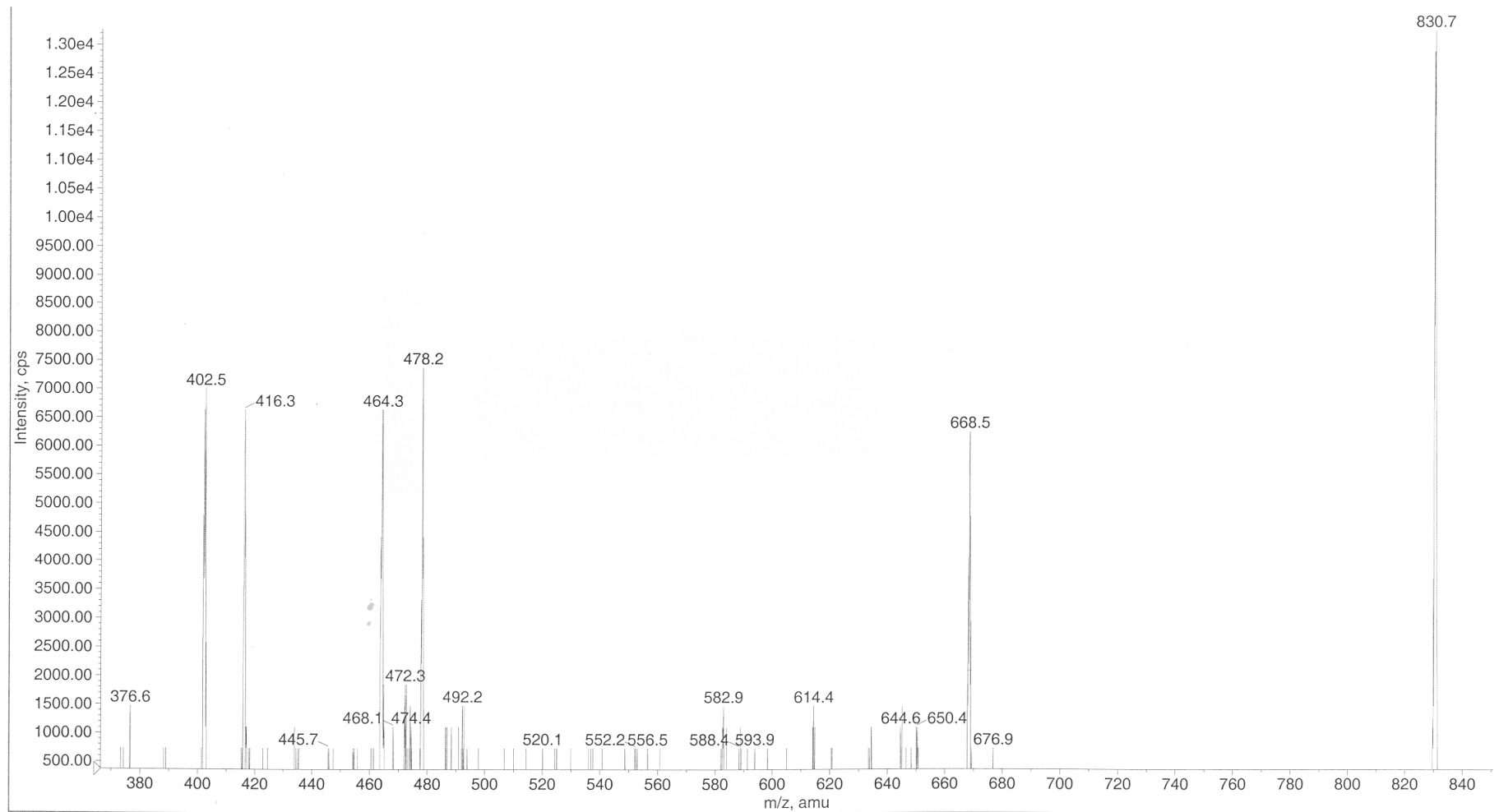
Spettro ESI MS della miscela dei composti **10b+10c**



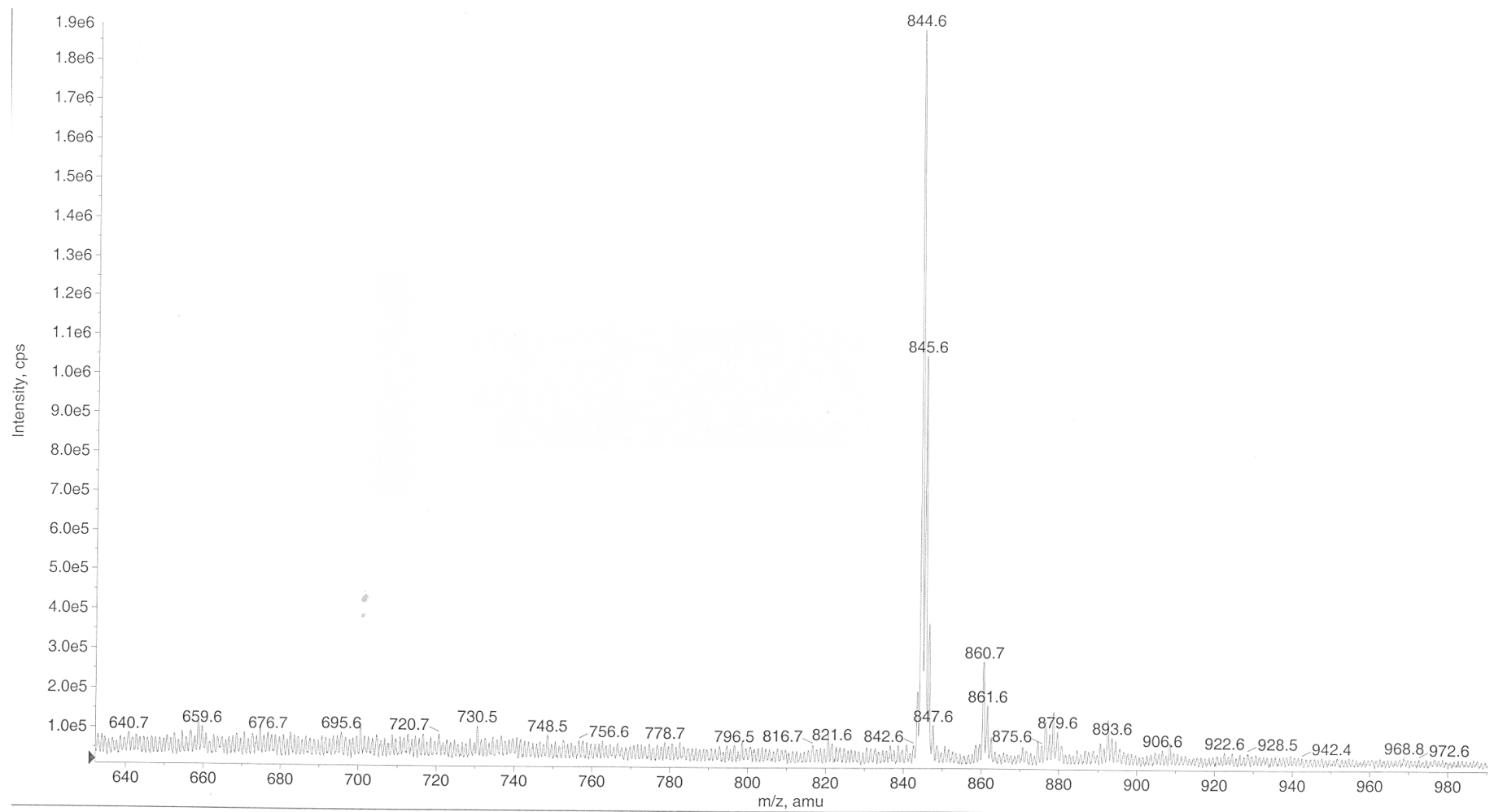
Spettro ESI MS/MS della miscela dei composti **10b+10c**



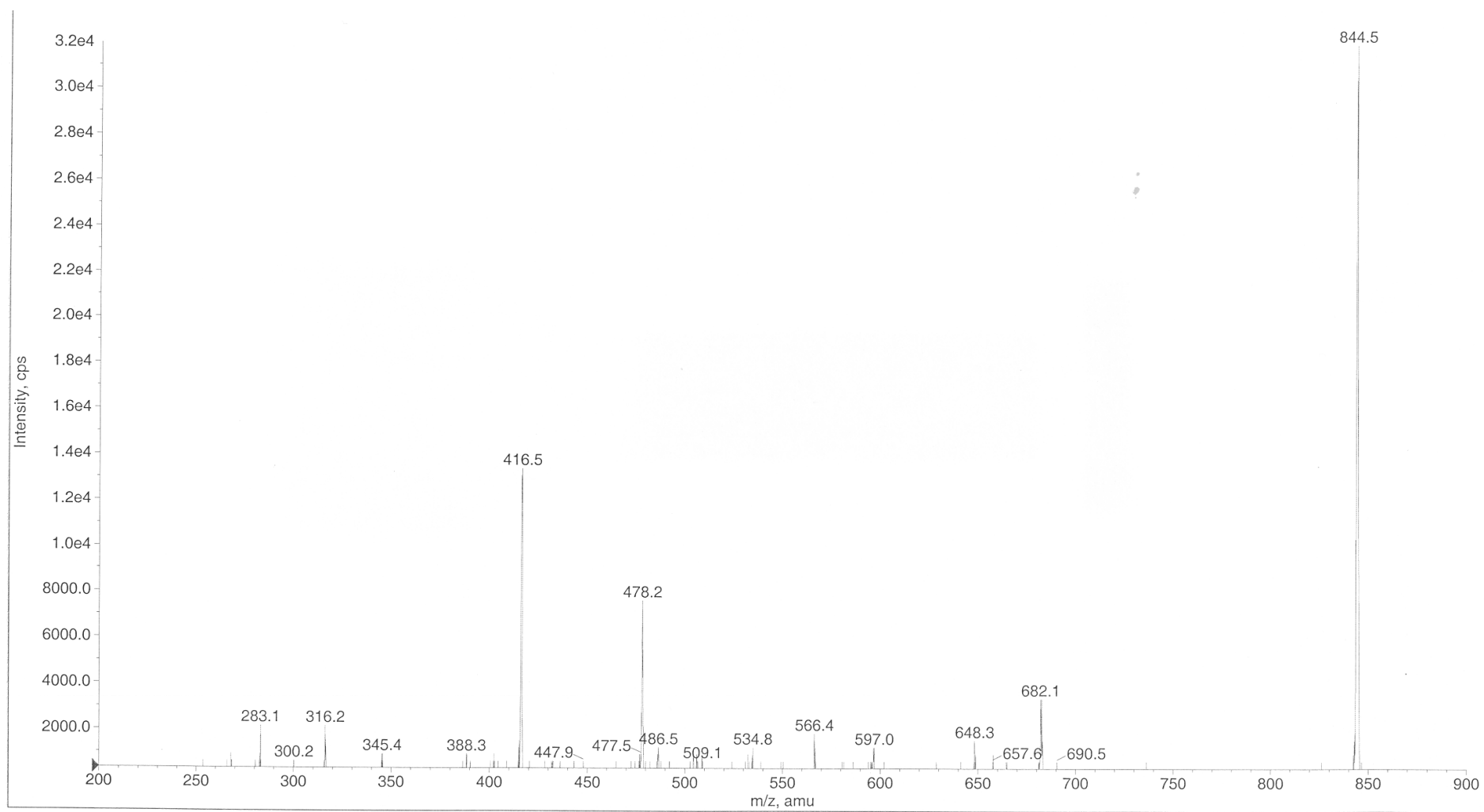
Spettro ESI MS della miscela dei composti **10d+10e**



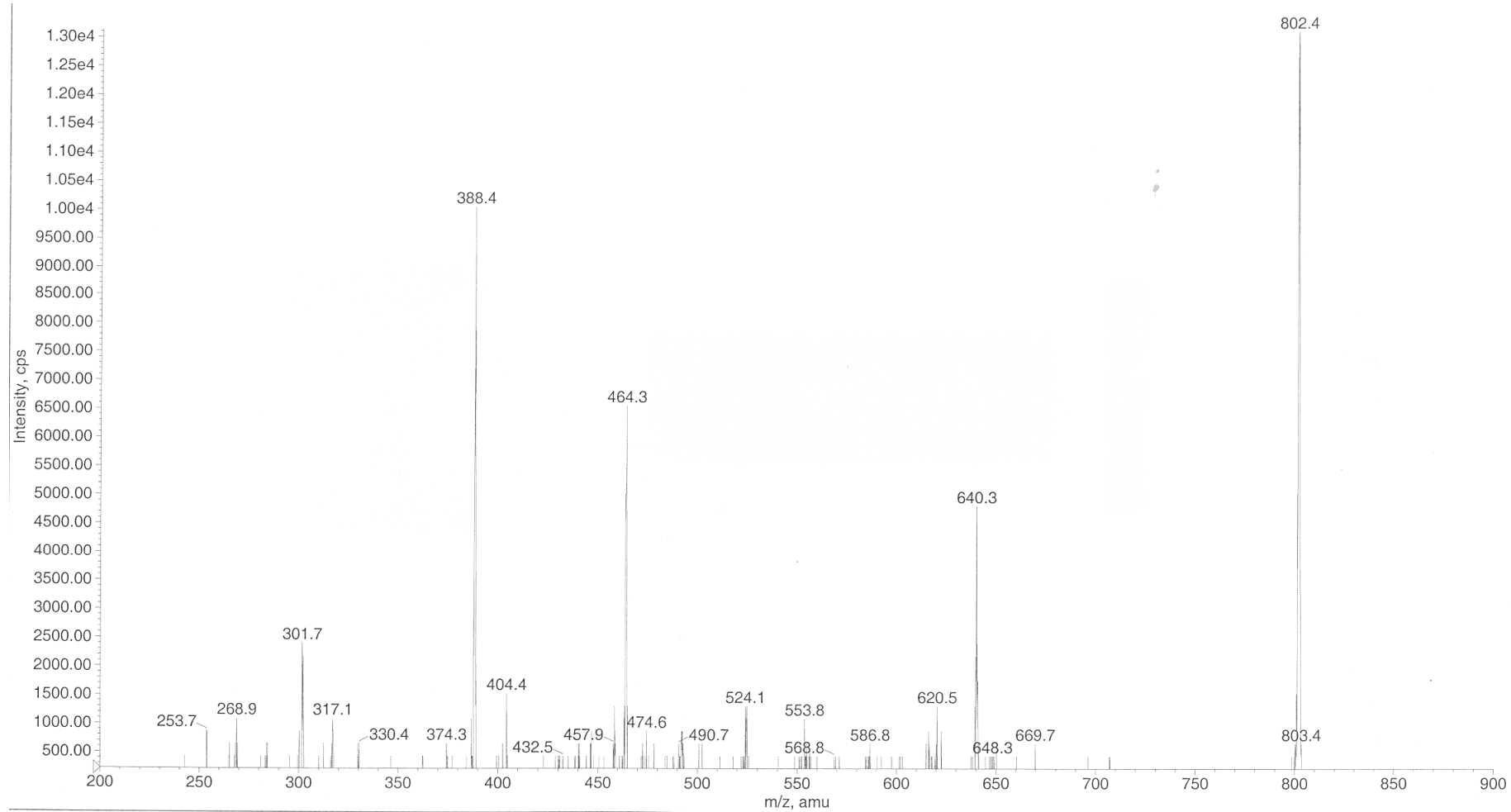
Spettro ESI MS/MS della miscela dei composti **10d+10e**



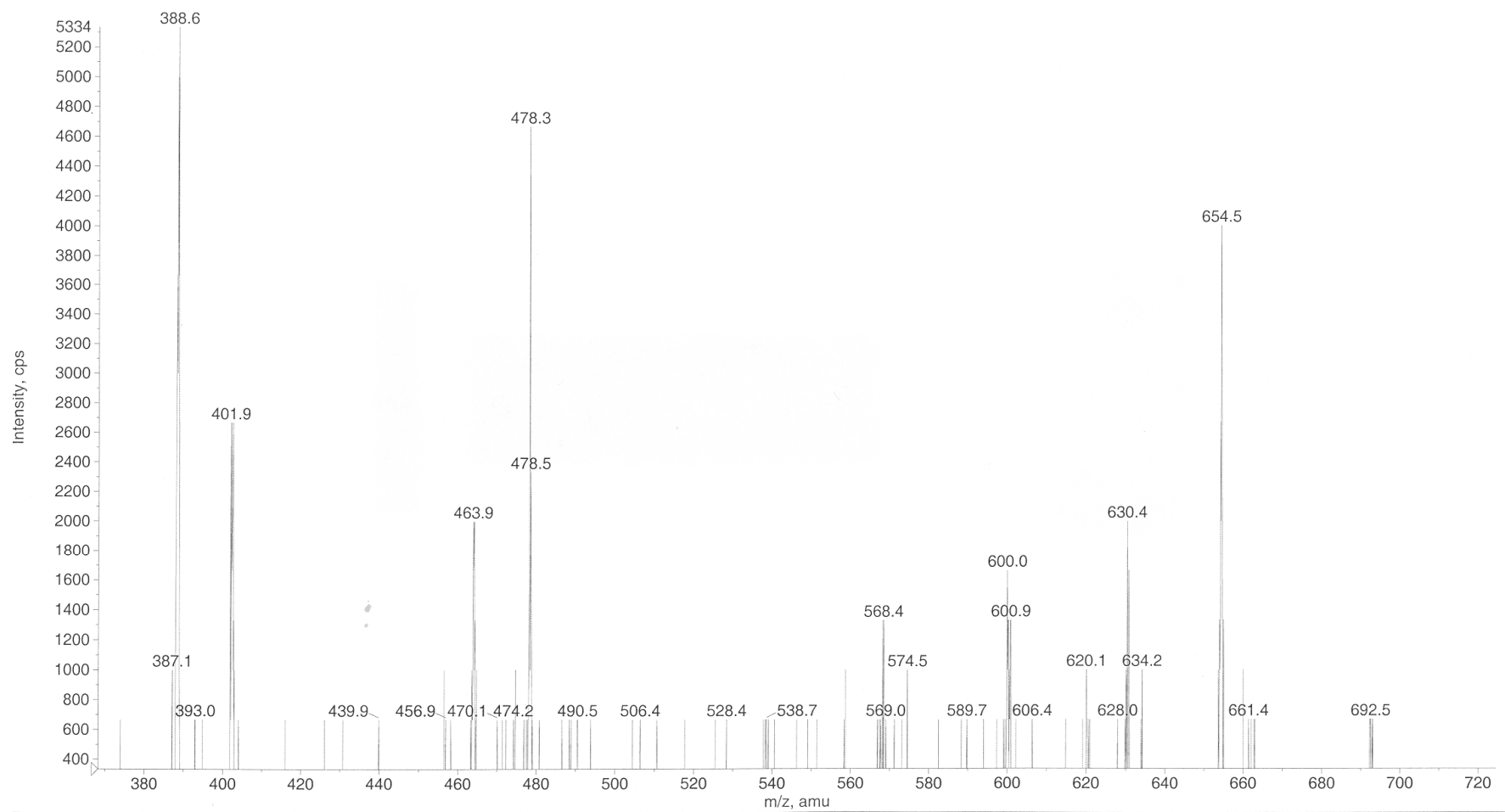
Spettro ESI MS del composto **10f**



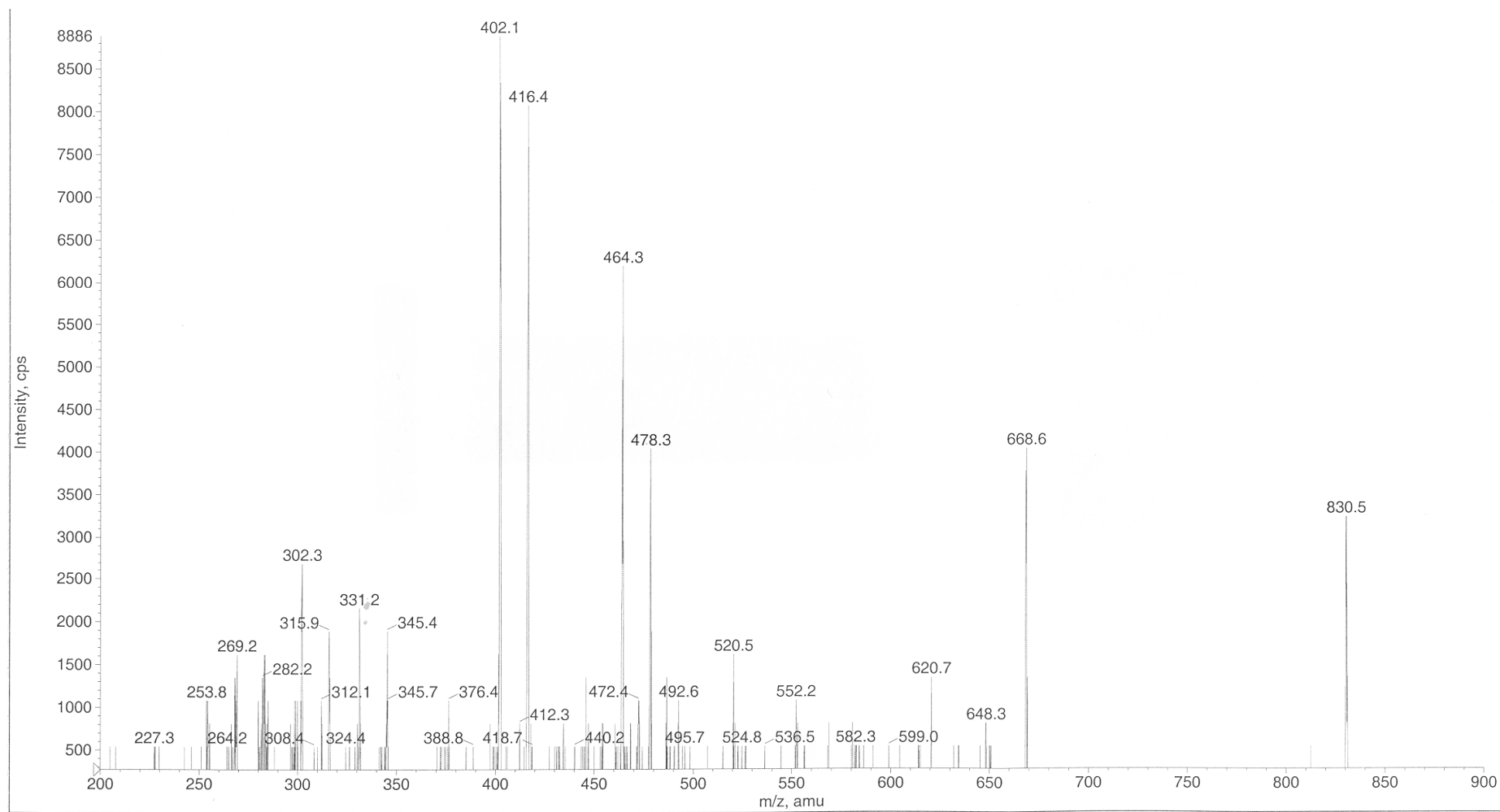
Spettro ESI MS/MS del composto **10f**



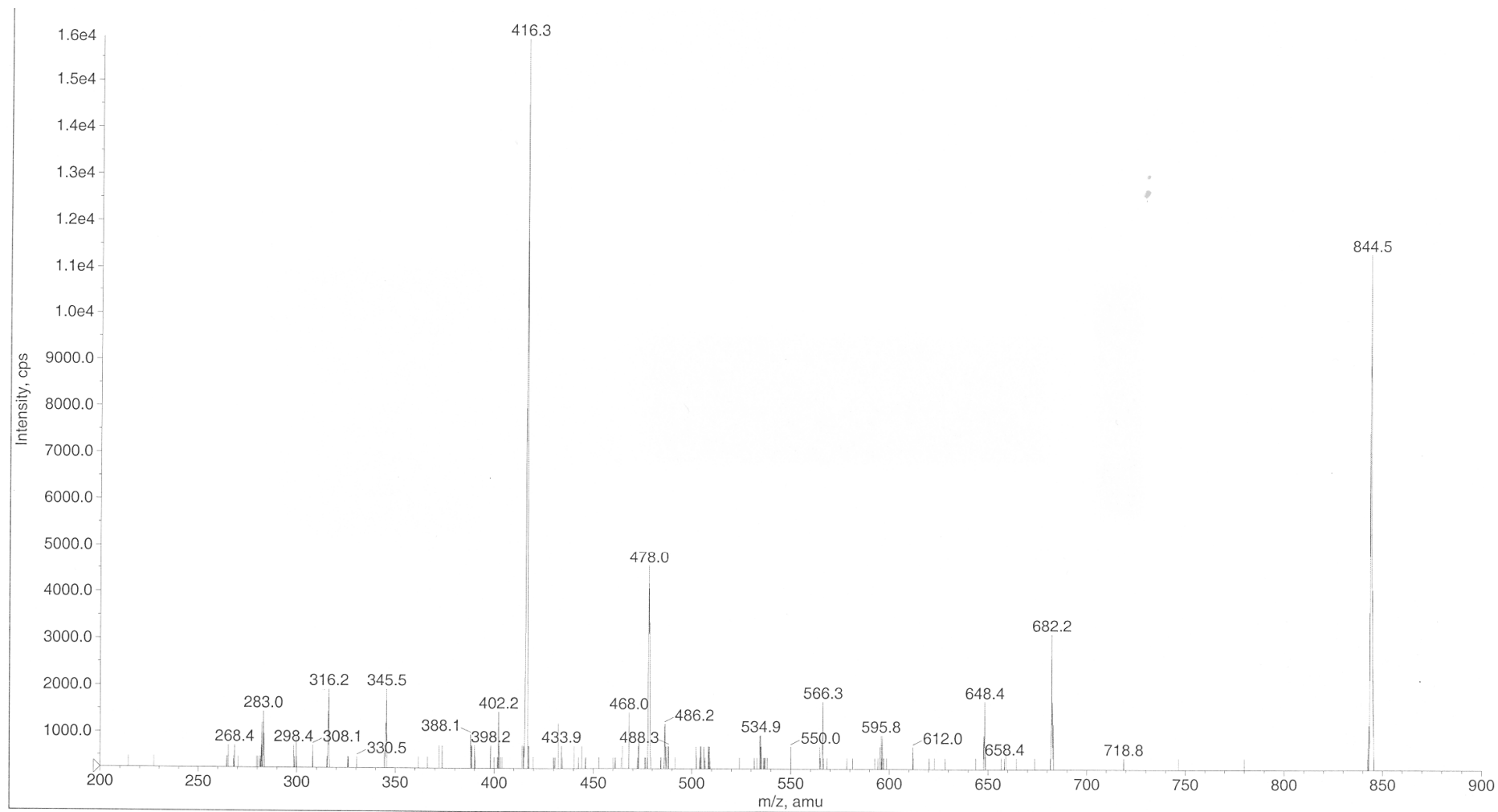
Spettro ESI MS/MS del composto **11a**



Spettro ESI MS/MS della miscela dei composti **11b+11c**



Spettro ESI MS/MS della miscela dei composti **11d+11e**



Spettro ESI MS/MS del composto **11f**